UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RAÍSSA SILVA TRISTÃO

Análise de polimorfismo em TET2 e TERT em neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas

Ribeirão Preto

2022

RAÍSSA SILVA TRISTÃO

Análise de polimorfismo em TET2 e TERT em neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Área de Concentração: Clínica Médica - Investigação Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Traina

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na publicação
Biblioteca da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Tristão, Raíssa Silva

Análise de polimorfismo em TET2 e TERT em neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas – Ribeirão Preto, 2022

84 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Programa de Pós Graduação em Clínica Médica.

Área de concentração: Investigação Biomédica.

Versão Corrigida

Orientadora: Traina, Fabíola

1.Neoplasias mieloproliferativas 2. Citogenética convencional 3. Polimorfismo TET2 4. Polimorfismo TERT.

APOIO E SUPORTE FINANEIRO

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP);

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP);

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HC FMRP/USP);

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-tronco e Terapia Celular (INCTC) – Projeto nº 14/50947-7;

Centro de Terapia Celular – Centro de pesquisa, inovação e difusão (CEPID/FAPESP) – Projeto nº 2013/08135-2.

Nome: TRISTÃO, R.S.

Título: **Análise de polimorfismo em TET2 e TERT em neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Clínica Médica - Investigação Biomédica.

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, familiares, noivo, com amor,
admiração e gratidão por sua compreensão,
carinho, presença e incansável apoio
ao longo do período de elaboração dessa
tese e em todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença protetora em minha vida, por ser meu guia, fortaleza e por conceder a sabedoria para realizar meus ideais.

Aos meus pais, irmãos, noivo e familiares pela estrutura familiar e amor incondicional que norteou minha vida. Obrigada pelo apoio e compreensão nessa jornada para alcançar minhas conquistas profissionais.

À minha orientadora Profa.Dra. Fabíola Traina, agradeço a oportunidade, confiança e orientação neste trabalho, e a extrema contribuição para a minha formação acadêmica e pessoal pelo exemplo de dedicação, ética e competência.

Às funcionárias da citogenética, por quem tenho imenso carinho, Virgínia Lipoli, Diva Hodniki, Ivana Barizza e Dra. Fernanda Borges da Silva, agradeço a contribuição ao meu aprendizado. Obrigada pela paciência e carinho dedicados a mim.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia e aos meus companheiros de pós-graduação obrigada pela contribuição nessa fase da minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, em especial aos Professores Coordenadores e secretários, agradeço pelo apoio acadêmico e oportunidade da realização do meu curso de mestrado.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Cota Institucional;

“Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)”;

“Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)”.

“O importante não é ver o que ninguém nunca viu,
mas sim pensar o que ninguém nunca pensou
sobre algo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Tristão, R.S. **Análise de polimorfismo em TET2 e TERT em neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas. 2022.** Tese (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são um grupo heterogêneo de distúrbios hematológicos sendo classificadas pela presença de alterações nas células da linhagem mieloide (granulócitos, eritrócitos e megacariócitos). As três principais entidades desse grupo conhecidas como NMP BCR::ABL1-negativas clássicas são a policitemia vera (PV), trombocitose essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP). As mutações em JAK2, CALR e MLP estão relacionadas ao fenótipo neoplásico. Estudos de associação genômica ampla (GWAS) sugerem que genes condutores adicionais podem predispor para o risco de desenvolver NMP, e influenciam o desenvolvimento, fenótipo ou a severidade dessas doenças. Os estudos multicêntricos revelaram que o polimorfismo TET2 (metilcitosina deoxigenase 2) rs3733609 C>T e o polimorfismo TERT (transcriptase reversa da telomerase) rs2736100 A>C têm um papel na fisiopatologia das NMPs. Os escores prognósticos atuais utilizam os dados clínicos, laboratoriais, citogenéticas e moleculares para o diagnóstico, monitoramento do tratamento e prognóstico em NMP. O objetivo desta pesquisa foi investigar e descrever as características demográficas, clínicas, laboratoriais, citogenéticas e moleculares, a frequência e o impacto clínico dos polimorfismos TET2 rs3733609 e TERT rs2736100 nos pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas: PV, TE e MFP do HC FMRP USP. A casuística incluiu uma coorte de 245 pacientes com diagnóstico de NMP BCR::ABL1-negativas clássicas: PV, TE e MFP, em acompanhamento regular no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC FMRP-USP) no período de 13 anos, de dezembro de 2006 a dezembro de 2019. Os dados demográficos, clínicos e de desfechos foram obtidos a partir da revisão dos prontuários físicos e/ou eletrônicos. O cariótipo foi investigado por citogenética convencional. A investigação dos polimorfismos nos genes *TET2* e *TERT* foi realizada pelo método de PCR em tempo real com sondas de hidrólise específicas. As analises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 9 (GraphPad Prism Software, Inc., CA, EUA). Duzentos e quarenta e cinco pacientes foram avaliados, 123 do sexo masculino e 122 do sexo feminino, mediana de idade de 73 anos. Cento e dezenove pacientes tiveram diagnóstico de MFP, nos quais a mutação $JAK2^{V617F}$ foi detectada em 71, mutação CALR em 25, mutação MPL em 5, e 18 foram considerados triplo-negativos. Setenta e dois pacientes tiveram diagnóstico de PV, nos quais a mutação JAK^{2V617F} foi detectada em 64, mutação JAK2 éxon 12 em 1 paciente e JAK2 selvagem em 7 pacientes. Cinquenta e quatro pacientes tiveram diagnóstico de TE, nos quais a mutação $JAK2^{V617F}$ foi detectada em 25, mutação CALR em 12 pacientes e 17 foram triplo-negativos. Dentre os 124 pacientes submetidos à análise citogenética, 107 apresentaram cariótipo normal. Entre 17 pacientes com alterações citogenéticas, 10 tiveram diagnóstico de MFP sendo um com cariótipo complexo. A alteração citogenética mais frequentemente observada foi a trissomia do cromossomo 8. Cento e vinte e um pacientes não obtiveram metáfases ou não foram submetidos à análise citogenética. Dos 245 pacientes, 227 foram genotipados para o polimorfismo TET2 rs3733609, 36 portaram o alelo polimórfico (C), dos quais 4 eram homozigotos (CC). Para TERT rs2736100, 242 foram genotipados, 152 portavam o alelo polimórfico (A) dos quais 33 pacientes eram homozigotos (AA). O polimorfismo TET2 rs3733609 TC + CC esteve associado com maior frequência de hipertensão arterial sistêmica (p=0,046) em pacientes com NMP clássicas com mutação $JAK2^{V617F}$, maior mediana de contagem de plaquetas (p=0,017) em pacientes com PV, e maior mediana de LDH (p=0,0087) e maior frequência de mutação em genes da via JAK/STAT (p=0,046) em pacientes com TE,

comparado com pacientes com polimorfismo TET2 rs3733609 TT. O polimorfismo TERT rs2736100 CA + AA esteve associado com menor valor da mediana de hemoglobina (p=0,0036), hematócrito (p=0,0055), contagem de neutrófilos (p=0,032), menor frequência de mutações no gene da JAK2V617F (p=0,025) e maior frequência de diabetes mellitus tipo 2 (p<0,0001) na coorte de pacientes com NMP clássicas, menor valor da mediana de hemoglobina (p=0,0025) na coorte de pacientes com NMP clássicas com mutação $JAK2^{V617F}$, menor mediana de contagem de leucócitos (p=0,02) e neutrófilos (p=0,009) na coorte de pacientes com PV, menor mediana de contagem de hemoglobina (p=0,0018) e hematócrito (p=0,005) em pacientes com MFP. A associação com uma importante entidade molecular de ordem etiológica para as NMP BCR::ABL1-negativas clássicas pode representar o envolvimento de fatores germinativos dignos de investigação não apenas para prática da genética médica, mas também pela dinâmica de aquisição da mutação condutora ao fenótipo neoplásico.

Palavra-Chave: Neoplasias mieloproliferativas; Citogenética convencional; Polimorfismo *TET2*; Polimorfismo *TERT*.

ABSTRACT

Tristão, R.S. **TET2 and TERT polymorphisms analysis in BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. 2022.** Tese (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a heterogeneous group of hematological disorders classified by the presence of alterations in myeloid lineage cells (granulocytes, erythrocytes and megakaryocytes). The three main entities in this group known as classic BCR::ABL1-negative MPN are polycythemia vera (PV), essential thrombocytosis (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Mutations in JAK2, CALR and MPL often drive the neoplastic phenotype. Genomic-wide association studies (GWAS) suggest that additional driver genes may predispose to the risk of developing MPN, and influence the development, phenotype, or severity of the diseases. Multicenter studies revealed that the TET2 (methylcytosine deoxygenase 2) rs3733609 C>T polymorphism and the TERT (telomerase reverse transcriptase) rs2736100 A>C polymorphism play a role in the pathophysiology of MPNs. Current prognostic scores use clinical, laboratory, cytogenetic, and molecular data for diagnosis, treatment monitoring, and prognosis in MPN. The aim of this research was to investigate and describe the demographic, clinical, laboratory, cytogenetic and molecular features, frequency and clinical impact of TET2 rs3733609 and TERT rs2736100 polymorphisms in patients with classic BCR::ABL1-negative MPN: PV, ET and PMF from Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC FMRP-USP). The casuistry was composed of 245 patients cohort diagnosed with classical BCR::ABL1- negative MPN: PV, ET and PMF, in regular follow-up at the HC FMRP USP for a period of 13 years, from December 2006 to December 2019. Demographic, clinical and outcome data were obtained from the review of physical and/or electronic medical records. The karyotype was investigated by conventional cytogenetics. The investigation of polymorphisms in the TET2 and TERT genes was performed by the real-time PCR method with specific hydrolysis probes. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 9 (GraphPad Prism Software, Inc., CA, USA). Two hundred and forty-five patients were evaluated, 123 males and 122 females, median age 73 years. One hundred and nineteen patients were diagnosed with PMF, in which the $JAK2^{V617F}$ mutation was detected in 71, CALR mutation in 25, MPL mutation in 5, and 18 were considered triple-negative. Seventy-two patients were diagnosed with PV, in which $JAK2^{V617F}$ mutation was detected in 64, JAK2 exon 12 mutation in 1 patient and wild-type JAK2 mutation in 7 patients. Fifty-four patients were diagnosed with ET, in which the $JAK2^{V617F}$ mutation was detected in 25, CALR mutation in 12 patients and 17 were triple-negative. Among the 124 patients submitted to cytogenetic analysis, 107 had a normal karyotype. Among 17 patients with cytogenetic alterations, 10 were diagnosed with PMF, one with a complex karyotype. The most frequently observed cytogenetic alteration was chromosome 8 trisomy. One hundred and twenty-one patients did not obtain metaphases or were not submitted to cytogenetic analysis. Of the 245 patients, 227 were genotyped for the TET2 rs3733609 polymorphism, 36 carried the polymorphic allele (C), of which 4 were homozygous (CC). For TERT rs2736100, 242 were genotyped, 152 carried the polymorphic allele (A) of which 33 patients were homozygous (AA). The TET2 rs3733609 TC + CC polymorphism was associated with a higher frequency of systemic arterial hypertension (p=0.046) in patients with classic MPN with $JAK2^{V617F}$ mutation, higher median platelet counts (p=0.017) in patients with PV, and higher median of LDH (p=0.0087) and higher frequency of mutation in JAK/STAT pathway genes (p=0.046) in patients with ET compared with patients with TET2 rs3733609 TT polymorphism. The TERT rs2736100 CA + AA polymorphism was

associated with lower median hemoglobin (p=0.0036), hematocrit (p=0.0055), neutrophil counts (p=0.032), lower frequency of mutations in the JAK2^{V617F} gene (p=0.025) and higher frequency of type 2 diabetes mellitus (p<0.0001) in the cohort of patients with classic MPN, lower median hemoglobin (p=0.0025) in the cohort of patients with classic MPN with JAK2^{V617F} mutation, lower median leukocyte (p=0.02) and neutrophil counts (p=0.009) in the cohort of patients with PV, lower median hemoglobin (p=0.0018) and hematocrit (p=0.005) in patients with PMF. The association with an important molecular entity of etiological order for classical BCR::ABL1-negative MPN may represent the involvement of germline factors worthy of investigation not only for the practice of medical genetics, but also for the dynamics of acquisition of the mutation leading to the neoplastic phenotype.

Key words: Myeloproliferative neoplasms; Conventional cytogenetics; TET2 polymorphism; TERT Polymorphism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP) 16

1.1.1 Definição e classificação das NMP 16

1.1.2 Critérios diagnósticos das NMP BCR::ABL1- negativas clássicas 18

1.1.3 Mutações recorrentes em NMP BCR::ABL1- negativas clássicas 21

1.1.4 Alterações citogenéticas e escores prognósticos em NMP BCR::ABL1-negativas clássicas 24

1.1.5 Mutações não recorrentes nos genes TET2 e TERT em NMP BCR::ABL1-negativas clássicas 27

1.1.6 Variantes germinativas em NMP BCR::ABL1- negativas clássicas 30

2 OBJETIVOS 33

2.1 OBJETIVO GERAL 33

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33

3 MATERIAIS E MÉTODOS 34

3.1 CASUÍSTICA 34

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS PARA EXAME DE CITOGENÉTICA 34

3.3 OBTENÇÃO DE DNA DE PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS 35

3.4 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS TET2 RS3733609 E TERT RS2736100 36

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 37

4 RESULTADOS 38

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS CLÁSSICA 38

4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO TET2 RS3733609 C>T E O TERT RS2736100 A>C E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS 44

4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O SNP TET2 RS3733609 C>T E O SNP TERT RS2736100 A>C E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM NMP E MUTAÇÃO $JAK2^{V617F}$ 50

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE O SNP TET2 RS3733609 C>T E O SNP TERT RS2736100 A>C E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM PV, TE E MFP 54

5 DISCUSSÃO 64

6 CONCLUSÕES 69

REFERÊNCIAS **70**

ANEXO 1 ..... **72**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EVOLUÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS..... 17
FIGURA 2 - FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES RECORRENTES NA COORTE DE PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS..... 41
FIGURA 3 - ANÁLISE CITOGENÉTICA COM TRISSOMIA NO CROMOSSOMO 8. 43
FIGURA 4 - ANÁLISE CITOGENÉTICA COM TRISSOMIA NO CROMOSSOMO 9. 43
FIGURA 5 - ANÁLISE CITOGENÉTICA COM MONOSSOMIA NO CROMOSSOMO 7. 44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CRITÉRIOS DIAGNÓSTICO PARA POLICITEMIA VERA. 18
TABELA 2 - CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA TROMBOCITEMIA ESSENCIAL. 19
TABELA 3 - CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA, PRÉ-FIBRÓTICA/ESTÁGIO INICIAL. 20
TABELA 4 - CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA, ESTÁGIO FIBRÓTICO. 21
TABELA 5 - ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO E ESCORE PROGNÓSTICO EM POLICITEMIA VERA. 25
TABELA 6 - ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO E ESCORE DE RISCO DE EVENTOS DE TROMBOSE EM TROMBOCITOSE ESSENCIAL (IPSET). 26
TABELA 7 - ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO E ESCORE PROGNÓSTICO EM MIELOFIBROSE PRIMPARIA. 27
TABELA 8 - CORRELAÇÃO DO SINAL DE FLUORESCÊNCIA. 36
TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES COM NMP CLÁSSICA: PV, TE E MFP. 39
TABELA 10 - ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS OBSERVADAS NOS PACIENTES COM DIAGNOSTICO DE NMP. 41
TABELA 11 - DESCRIÇÃO DAS ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS DEFINIDAS PELA CITOGENÉTICA CONVENCIONAL. 42
TABELA 12 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DE SNP TET2 RS3736609 C>T EM NEOPLASIA MIELOPROLIFERATIVA CLÁSSICA. 45
TABELA 13 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DE SNP TERT RS2736100 C>A EM NEOPLASIA MIELOPROLIFERATIVA CLÁSSICA. 45
TABELA 14 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES COM NMP E POLIMORFISMO EM TET2 RS3736609 E TERT RS2736100. 47
TABELA 15 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES COM NMP MUTAÇÃO $JAK2^{V617F}$ E POLIMORFISMO TET2 RS3736609 E TERT RS2736100. 51
TABELA 16 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES COM PV E POLIMORFISMO TET2 RS3736609 C > T E TERT RS2736100 A > C. 55
TABELA 17 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES COM TE E POLIMORFISMO EM TET2 RS3736609 E TERT RS2736100. 58
TABELA 18 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES COM MFP (N=119) E POLIMORFISMO EM TET2 RS3736609 E TERT RS2736100. 61

1 INTRODUÇÃO

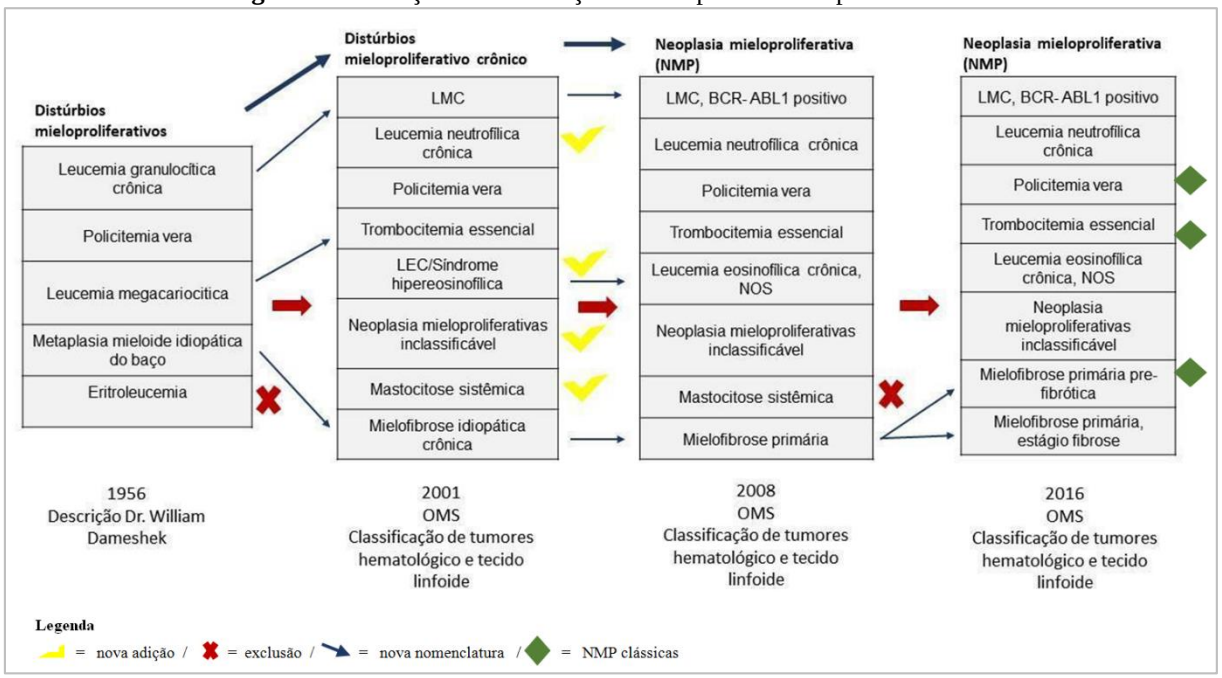
1.1 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP)

1.1.1 Definição e classificação das NMP

Neoplasias mieloproliferativas (NMP) são doenças clonais que acometem a célula-tronco hematopoética (CTH) e são caracterizadas por fenótipo hiperproliferativo de células mieloides maduras na medula óssea e no sangue periférico (SP). As NMP compartilham características clínicas, morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e moleculares, mas constituem um grupo heterogêneo de doenças hematológicas (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (MEIER; BURTON, 2017) (THIELE; KVASNICKA; VARDIMAN, 2006) (NANGALIA; GREEN, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), conforme revisão proposta em 2017, classifica as NMP em NMP BCR::ABL1-positiva, que compreende a leucemia mieloide crônica (LMC); e as NMP BCR::ABL1-negativas, que compreendem as demais NMP: leucemia neutrofílica crônica (LNC), policitemia vera (PV), mielofibrose primária (MFP), trombocitemia essencial (TE), leucemia eosinofílica crônica (LEC) e NMP não classificável (Figura 1). As NMP BCR::ABL1-negativas mais frequentes são PV, TE e MFP denominadas de NMP BCR::ABL1-negativas clássicas (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (SHALLIS et al., 2020).

Figura 1 - Evolução e classificação das neoplasias mieloproliferativas.



Evolução da classificação das neoplasias mieloproliferativas (NMP) conforme descoberta das mutações subjacentes a LMC, PV, TE e MFP. Neoplasias mieloproliferativas BCR::ABL1- negativas clássicas compreendem a policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP). Adaptado (SHALLIS et al., 2020)

Os primeiros estudos sobre NMP datam de 1845, desde então, a semiologia das NMP foi determinada com base em mecanismos moleculares e clínicos dos pacientes. Em 1951 as NMP foram definidas como "distúrbios mieloproliferativos" pelo hematologista Dr. William Dameshek. O cromossomo Philadelphia e o gene de fusão BCR::ABL1, que conduzem a patogênese da LMC, foram descobertos em 1960 e 1990, respectivamente, e elucidaram a natureza clonal e neoplásica da doença. Em 2005, a descoberta da mutação JAK2^{V617F} elucidou o papel da sinalização JAK/STAT na patogênese das NMP BCR::ABL1-negativas. Aproximadamente 95% dos pacientes com PV, 41-57% com TE e 43 -57% com MFP têm a mutação JAK2^{V617F}. Em 2007, foi descoberta a mutação no éxon 12 da JAK2, que está presente em 5% dos pacientes com PV. Em 2006, a mutação no éxon 10 do MPL foi identificada em 5% dos pacientes com TE e MFP JAK2^{V617F}-negativa. Em 2013, foi descrita a mutação no éxon 9 de CALR em 20-25% dos pacientes com TE e 25-30% em MFP. As mutações em JAK2, MPL e CALR ativam a via de sinalização JAK/STAT e contribuem para o fenótipo das NMP-BCR::ABL1-negativas. Aproximadamente 10% dos pacientes com TE e MFP não possuem mutações em JAK2, MPL e CALR, e são denominados NMP triplo- negativos. A identificação de mutações recorrentes contribuiu para a compreensão da fisiopatologia, classificação e tratamento das NMP BCR::ABL1- negativas clássicas (SHALLIS et al., 2020).

1.1.2 Critérios diagnósticos das NMP BCR::ABL1- negativas clássicas

A policitemia vera (PV) é a mais frequente das NMP BCR::ABL1- negativas clássicas, caracterizada pelo aumento da produção de glóbulos vermelhos independente dos mecanismos que normalmente regulam a eritropoese. Aproximadamente em 20% dos casos a primeira manifestação clínica dos pacientes com PV é a trombose arterial ou a venosa resultando em acidente vascular encefálico, trombose venosa profunda, infarto do miocárdio, oclusão da artéria ou veia da retina, ataque isquêmico transitório, eritromelalgia e síndrome de Budd-Chiari. Outros sinais e sintomas incluem doença de von Willebrand, hiperuricemia, hipertensão, fadiga, sudorese noturna, prurido, esplenomegalia e hepatomegalia que comprometem a qualidade de vida (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (MEIER; BURTON, 2017).

O diagnóstico de PV baseia-se em três critérios clínicos: (*i*) eritrocitose (hemoglobina > 16,5 g/dL em homens e >16,0 g/dL em mulheres; ou hematócrito > 49% em homens e > 48% em mulheres; ou contagem de eritrócitos > 25% do valor de referência); (*ii*) biópsia de medula óssea com hipercelularidade das séries hematopoéticas para a idade;(*iii*) presença da mutação no gene JAK2 (exon 14 ou 12). Na ausência de um dos critérios acima mencionado, a confirmação do diagnóstico pode ser realizada pela análise da eritropoetina no soro, e essa deve estar em níveis subnormais (Tabela 1) (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (BARBUI et al., 2014) (MASLAH et al., 2020).

Tabela 1 - Critérios diagnóstico para policitemia vera.

O diagnóstico de policitemia vera requer os três critérios maiores ou os dois primeiros critérios maiores mais o critério menor.

Critérios maiores

1. Concentração elevada de hemoglobina (> 16,5g/dL em homens; > 16,0 g/dL em mulheres) ou hematócrito elevado (> 49% nos homens; > 48% nas mulheres) ou massa de glóbulos vermelhos aumentada (> 25% acima do valor médio previsto normal).

2. Biópsia da medula óssea mostrando hipercelularidade ajustada à idade com crescimento das três linhagens, incluindo proliferação eritroide, granulocítica e megacariocítica proeminente com megacariócitos maduros pleomórficos.

3. Presença da mutação JAK2V617F ou JAK2 éxon 12

Critério menor

Nível sérico normal de eritropoetina.

Adaptado de (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017).

Trombocitemia essencial (TE) é caracterizada por trombocitose (plaquetas ≥ 450 x 10^9/L) no sangue periférico e aumento do número de megacariócitos maduros na medula óssea. Clinicamente, na ocasião do diagnóstico, alguns pacientes apresentam eventos tromboembólicos como ataques isquêmicos transitórios, isquemia digital com parestesias e gangrena, ou eventos hemorrágicos durante o curso da doença. Outras causas de trombocitose devem ser excluídas, incluindo outras NMP, doenças inflamatórias e infecciosas, hemorragias e outras neoplasias (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (ALVAREZ-LARRAN et al., 2018).

Os critérios de diagnóstico para a TE são: (*i*) contagem de plaquetas ≥ 450x10^9/ L; (*ii*) biópsia da medula óssea com proliferação da linhagem megacariocitica com aumento de megacariócitos maduros e com o núcleo hiperlobulado, sem desvio à esquerda de neutrófilos, fibras de reticulina grau 1; (*iii*) exclusão do diagnóstico de LMA, SMD e outras neoplasias; (*iv*) presença da mutação JAK2^{V617F}, MPL ou CALR. Na ausência desses critérios o diagnóstico pode ser confirmado pela presença de um marcador clonal ou exclusão de trombocitose reativa (Tabela 2) (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017).

Tabela 2 - Critérios de diagnóstico para trombocitemia essencial.

O diagnóstico de trombocitemia essencial exige que todos os critérios maiores ou os três primeiros critérios maiores, além do critério menor, sejam atendidos.

Critérios maiores

1. Contagem de plaquetas ≥ 450 x 10^9/L

2. Biópsia da medula óssea mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariocítica, com aumento do número de megacariócitos maduros com núcleos hiperlobulados; nenhum aumento significativo ou desvio à esquerda na granulocitopoese ou eritropoese dos neutrófilos; muito raramente um aumento pequeno nas fibras de reticulina (grau 1).

3. Critérios da OMS para leucemia mieloide crônica BCR::ABL1 positiva, policitemia vera, mielofibrose primária ou outras neoplasias mieloides não são atendidos.

4. Mutação JAK2, CALR ou MPL.

Critério menor

Presença de um marcador clonal ou ausência de evidência de trombocitose reativa.

Adaptado de (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017).

A mielofibrose primária (MFP) é caracterizada pela proliferação anormal de megacariócitos e granulócitos, presença de depósito de tecido conectivo fibroso na medula óssea e hematopoese extramedular. A MFP apresenta uma evolução gradual da fase inicial pré-

fibrótica, caracterizada pela hipercelularidade da medula óssea com ausência ou mínima presença de fibrose reticular para a fase de fibrose na medula óssea com osteosclerose. (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (SAEIDI, 2016) (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

Pacientes com MFP manifestam sintomas constitucionais incluindo fadiga, dispneia, perda de peso, suores noturnos, febre e/ou caquexia, os quais refletem a atividade biológica da doença e comprometem a qualidade de vida (BARBUI et al., 2018).

O diagnóstico da MFP no estágio pré-fibrótico baseia-se em três critérios: (*i*) biópsia de medula óssea com proliferação megacariocitica e atipia, fibrose reticulinea grau 1 acompanhado do aumento da celularidade da medula óssea com proliferação granulocítica e, com frequência, redução da eritropoiese; (*ii*) exclusão do diagnóstico de LMC, PV, TE, SMD e outras neoplasias mieloides; (*iii*) presença de uma das três principais mutações $JAK2^{V617F}$, MPL, CALR ou de outro marcador clonal (ASXL1, EZH2, TET2, IDH1, IDH2, SRSF2 e SF38I), ou ausência de fibrose reticulínica reativa na medula óssea. Na ausência dos critérios acima mencionados, o diagnóstico para MFP estágio pré-fibrótico é baseado na presença de anemia, e/ou leucocitose $\geq 11 \times 10^9$/L, e/ou esplenomegalia palpável, e/ou nível aumentado de LDH (Tabela 3) (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017).

Tabela 3 - Critérios de diagnóstico para mielofibrose primária, pré-fibrótica/estágio inicial.

O diagnóstico de mielofibrose primária pré-fibrótica requer que todos os três critérios maiores e pelo menos um critério menor sejam atendidos.

Critérios maiores

1. Proliferação megacariocítica e atipia, sem fibrose reticulina > grau 1, acompanhadas por aumento da celularidade da medula óssea ajustada à idade, proliferação granulocítica e (frequentemente) diminuição da eritropoese.

2. Os critérios da OMS para leucemia mieloide crônica BCR::ABL1 positiva, policitemia vera, trombocitemia essencial, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mieloides não são atendidos.

3. Mutação JAK2, CALR ou MPL ou presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reticulínica reativa na medula óssea.

Critérios menores

Presença de pelo menos um dos seguintes, confirmado em 2 determinações consecutivas:

- Anemia não atribuída a uma comorbidade
- Leucocitose $\geq 11 \times 10^9$/L
- Esplenomegalia palpável
- Nível de lactato desidrogenase acima do limite superior do intervalo de referência institucional.

Adaptado de (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017).

A fase fibrótica da MFP é caracterizada pela presença de leucoeritroblastose no sangue periférico, hepatomegalia, esplenomegalia, aumento no número de células CD34+ circulantes. O diagnóstico de MFP em estágio fibrótico considera os critérios clínicos mencionados para o estágio pré-fibrótico, contudo com modificação no critério (*i*), no qual a medula óssea apresenta proliferação megacariocítica e atipia, com fibrose reticulinica e/ou colágeno grau 2 ou 3. A leucoeritroblastose foi incluída como critério menor (Tabela 4) (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (BARBUI et al., 2018).

Tabela 4 - Critérios de diagnóstico para mielofibrose primária, estágio fibrótico.

O diagnóstico de mielofibrose primária, estágio fibrótico exige que todos os três critérios maiores e pelo menos um critério menor sejam atendidos.

Critérios maiores

1. Proliferação megacariocítica e atipia, acompanhadas de reticulina e/ou fibrose colágena graus 2 ou 3.
2. Os critérios da OMS para trombocitemia essencial, policitemia vera, leucemia mieloide crônica BCR::ABL1 positiva, síndrome mielodisplásica ou outras neoplasias mieloides não são atendidos.
3. Mutação JAK2, CALR ou MPL ou presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reticulínica reativa na medula óssea.

Critérios menores

Presença de pelo menos um dos seguintes, confirmado em 2 determinações consecutivas:

- Anemia não atribuída a outra comorbidade
- Leucocitose $\geq 11 \times 10^9$/L
- Esplenomegalia palpável
- Nível de lactato desidrogenase acima do limite superior do intervalo de referência institucional
- Leucoeritroblastose

Adaptado de (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017).

As três NMP clássicas apresentam similaridades clínicas e fisiopatológicas, a evolução clínica está relacionada ao risco de progressão para mielofibrose secundária e/ou transformação leucêmica (SHALLIS et al., 2020) (SPIVAK, 2017) (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

1.1.3 Mutações recorrentes em NMP BCR::ABL1- negativas clássicas

A fisiopatologia das NMP clássicas está associada à desregulação da via de sinalização JAK/STAT, que culmina com uma proliferação exacerbada dos progenitores mieloides (granulocítica, eritrocítica e/ou megacariocítica) com capacidade funcional e diferenciação preservada. Essa proliferação anormal é resultante de mutações somáticas adquiridas nos genes

JAK2, MPL ou CALR (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (TEFFERI; PARDANANI, 2015) (NANGALIA; GRINFELD; GREEN, 2016)

A proteína JAK2 (Janus quinase 2) codificada pelo gene homônimo localizado no cromossomo 9p24, pertence à família das Janus quinases (JAK) e é uma proteína citoplasmática com atividade tirosinoquinase. A família de proteínas JAK é constituída por quatro membros: JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 (Tirosinoquinase 2). A mutação $JAK2^{V617F}$ resulta na substituição de um aminoácido valina por uma fenilalanina no códon 617 de JAK2, afetando a domínio JH2 desta proteína. JAK2 apresenta domínios homólogos, JH1 e JH2, sendo que o primeiro apresenta atividade tirosinoquinase e o segundo é um domínio pseudoquinase. O domínio pseudoquinase apresenta uma importante função regulatória para JAK2, uma vez que exerce efeito autoinibitório, regulando negativamente a atividade catalítica de JH1 na ausência de estímulos. A mutação $JAK2^{V617F}$ e mutação no éxon 12 resultam na perda desta capacidade autoinibitória. Desta forma, estas alterações moleculares provocam autofosforilação de JAK2 mesmo na ausência da ligação de citocinas e fatores de crescimento (MASCARENHAS ET AL., 2014; HUBBARD, 2018) (VARDIMAN ET AL., 2009) (MASCARENHAS ET AL., 2014) (SZUBER E TEFFERI, 2017).

A proteína JAK2 participa da sinalização mediada pela ligação de eritropoetina, trombopoetina, interleucina 3, fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Durante o processo normal de sinalização celular, a ligação de citocinas específicas à proteína JAK2 provoca a fosforilação da mesma. Uma vez ativada, a proteína quinase fosforila proteínas da família STAT, resultando em ativação de vias de sinalização intracelular, como STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK. A mutação $JAK2^{V617F}$ provoca autofosforilação de JAK2 e ativação constitutiva destas vias, contribuindo para a fisiopatologia das NMPs (TORRES et al., 2022).

A mutação em JAK2 pode dar origem a três doenças fenotipicamente distintas sendo que essa mutação pode ser encontrada em aproximadamente 95%, 55% e 65% dos pacientes com PV, TE e MFP respectivamente, mas é encontrada também em alguns pacientes com SMD/NMP (por exemplo, anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose) e, raramente, em LMA, SMD ou LMC (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017) (BAXTER ET AL., 2005; JAMES ET AL., 2005; KRALOVICS ET AL., 2005; LEVINE ET AL., 2005)

Aproximadamente 5% dos pacientes com PV apresentam a mutação somática com ganho de função no éxon 12 de JAK2 na região de ligação entre os domínios JH2 e JH1. As mutações no éxon 12 de JAK2 são deleções, mutações de ponto ou duplicações, afetando

principalmente sete resíduos de aminoácidos altamente conservados (F537 – E543). A mutação no éxon 12 da JAK2 induz a ativação constitutiva da via JAK/STAT5 e induz a proliferação celular independente de citocinas (MASCARENHAS ET AL., 2014; SZUBER E TEFFERI, 2017).

Em 2002, foi descrita uma mutação pontual no domínio transmembrana da proteína MPL. O gene MPL está localizado no cromossomo 1p34, inclui 12 exons, é um proto-oncogene homólogo ao oncogene do vírus da leucemia mieloproliferativa (v-MPL), e codifica o receptor de trombopoetina (MPL ou TPOR) que exerce a regulação da megacariopoese nas células tronco hematopoéticas (CTH), plaquetas e megacariócitos, baço e fígado (GRINFELD, NANGALIA E GREEN, 2017).

Mutações missenses no MPL são identificados em 4% dos pacientes com TE e 8% dos pacientes com MFP (PARDANANI et al., 2006; PIKMAN et al., 2006). As mutações MPL ocorrem preponderantemente no éxon 10, sendo as mais frequentes MPL W515L/K, e tornam a sinalização do receptor de trombopoetina independente do ligante (SAIEDI, 2016; O'SULLIVAN E HARRISON, 2017), (CARBAGNOLS ET AL., 2016; VARGHESE ET AL., 2017) (GRINFELD ET AL., 2017).

Aproximadamente 30 – 45 % dos pacientes com NMP são negativos para as mutações JAK2 e MPL. A análise do genoma com a técnica de sequenciamento de nova geração permitiu a descoberta de outras mutações em NMP. Em 2013, as mutações no gene CALR (calreticulina) foram relatadas em pacientes com TE e MFP negativos para as mutações em JAK2 e em MPL (LEE; GODFREY; NANGALIA, 2020).

O gene CALR está localizado no cromossomo 19p13.2 e possui nove éxons. A proteína CALR possui três domínios principais: um domínio N-terminal de ligação a lectinas, um domínio P rico em prolina e um domínio C-terminal (LAVI, 2014). A proteína CALR exerce um papel no retículo endoplasmático como uma proteína chaperona, assegura o envelopamento de novas glicoproteínas e regula a homeostase do cálcio (GRINFELD; NANGALIA; GREEN, 2017; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017). As mutações em CALR são classificadas de acordo com a deleção somática ou inserção no éxon 9 do gene CALR que resulta em um deslocamento de um par de bases na leitura do aminoácido na sequência do DNA, assim a proteína mutante adquire um novo C terminal (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017) (NANGALIA; GREEN, 2017a) (TEFFERI, 2010). CALR mutada se liga permanentemente ao receptor de trombopoetina (MPL) ativando sua sinalização, independente do seu ligante, a mudança da carga eletrostática no domínio C-terminal de CALR é crucial para sua interação com MPL e a presença de MPL é essencial para

função mutada de CALR (O'SULLIVAN E HARRISON, 2017; HOBBES, ROZELLE E MULLALLY, 2017) (GRINFELD; NANGALIA; GREEN, 2017; HAN ET AL., 2016).

1.1.4 Alterações citogenéticas e escores prognósticos em NMP BCR::ABL1-negativas clássicas

Ao diagnóstico, as alterações citogenéticas são detectadas em menos de 5% nos pacientes com TE, 15% dos pacientes com PV e de 30-50% dos pacientes com MFP, sendo que as alterações mais comuns são trissomia dos cromossomos 8 e 9, del(20q), ganho de material no 1q, del(1q) e del(13q). A frequência das alterações cromossômicas aumenta com a progressão da doença, sendo vistos em quase 80-90% dos casos de mielofibrose pós policitemia vera. NMP que progridem para a fase acelerada ou fase blástica geralmente apresentam anormalidades citogenéticas, incluindo aquelas comumente observadas na SMD e na LMA (SEVER et al., 2013) (GANGAT et al., 2008). As alterações citogenéticas são um dos fatores que contribuem para a sobrevida dos pacientes com NMP e o sistema de pontuação prognóstica difere entre PV, TE e MFP (BARRACO et al., 2018). (BARBUI et al., 2018).

O grupo de estudo internacional para pesquisa e tratamento de NMP (IWT-MRT) avaliou mais de 1500 pacientes com PV segundo critérios da OMS e identificou que a idade, leucocitose, e a alteração no cariótipo são fatores de risco independentes para a sobrevida global e sobrevida livre de leucemia. Além disso, a ocorrência de trombose venosa foi identificada como fator de risco para a sobrevida global. As alterações citogenéticas são classificadas em três grupos de risco: baixo risco (cariótipo normal, trissomia do cromossomo 8 e 9), risco intermediário (del(20q), qualquer alteração na região q do cromossomo 1, e cariótipo com duas ou mais alterações) e alto risco (cariótipo complexo) (TEFFERI et al., 2013).

Alterações no cariótipo são encontradas em 5-10% dos casos de TE segundo o levantamento realizado pelo Grupo de Estudo de Policitemia Vera (PVSG) e em 7,7% dos casos definidos pela OMS. Não há alteração citogenética característica de TE, as mais frequentemente são a trissomia do 8 e 9, além de deleção 13q e 20q. As alterações cromossômicas envolvendo del(5q), t(3;3)(q21;q26,2) e inv(3)(q21q26.2) são associadas à trombocitose. As alterações citogenéticas em TE são classificadas em três grupos de risco: baixo risco (cariótipo normal, trissomia do cromossomo 8 e 9), risco intermediário (del(20q), del(13q), e cariótipo com duas ou mais alterações, del(5q), t(3;3)(q21;q26,2) e inv(3)(q21q26.2)) e alto risco (cariótipo

complexo) (CHRISTINE J. HARRISON, 2009)(DOS SANTOS et al., 2011)(TEFFERI et al., 2017).

As alterações cromossômicas mais prevalentes em MFP são del(20q), del(13q), trissomia do 9 e alterações do cromossomo 1. As alterações citogenéticas em MFP são classificadas em três grupos de risco: baixo risco (cariótipo normal, del(20q), del(13q), del(Y), translocação ou duplicação cromossomo 1, +9), risco intermediário (+8, del(7q), del(5q), cariótipo complexo sem alterações de alto risco e qualquer monossomia sem ser -7) e alto risco (-7, inv(3)/3q21, i(17q), del(12)/12p11.2 e del(11q)/11q23) (CARAMAZZA et al., 2011)(TAM et al., 2009b).

Escores prognósticos que integram características clínicas, laboratoriais e moleculares são definidos para PV, TE e MFP. O escore prognóstico para PV compreende os parâmetros e pontuações respectivas: idade > 67 anos (5 pontos), idade ≥ 57 a 66 anos (2 pontos), leucócitos ≥ 15 x 10^9/L e trombose venosa (1 ponto). Desde modo, os pacientes com PV são classificados em três grupos; baixo risco (nenhum ponto adverso), intermediário- I (1 – 2 pontos adversos) e alto risco (≥ 3 pontos adversos) (**Tabela 5**) (TEFFERI et al., 2013).

Tabela 5 - Estratificação de risco e escore prognóstico em policitemia vera.

Fatores	Pontuação
Idade > 67 anos	5 pontos
Idade ≥57 a 66 anos	2 pontos
Leucócitos ≥15 x 10^9/L	1 ponto
Trombose venosa1	1 ponto
Estratificação de risco	Escore
Baixo	0
Intermediário	1 - 2
Alto	≥ 3

O escore prognóstico para policitemia vera (PV) compreende os parâmetros e pontuações respectivas: idade > 67 anos (5 pontos), idade ≥ 57 a 66 anos (2 pontos), leucócitos ≥ 15 x 109/L e trombose venosa (1 ponto). Desde modo, os pacientes com PV são classificados em três grupos; baixo risco (nenhum ponto adverso), intermediário - I (1 - 2 pontos adversos) e alto risco (≥ 3 pontos adversos).

A história natural da TE é caracterizada por um aumento da incidência de complicações vasculares e uma tendência a evoluir para mielofibrose e/ou LMA. As complicações vasculares contribuem para morbidade e mortalidade e para melhor predizer a ocorrência de eventos

trombóticos, um escore prognóstico internacional de trombose para TE (IPSET-trombose) foi desenvolvido. Os parâmetros são idade > 60 anos (1 ponto), histórico prévio de trombose (2 pontos), risco cardiovascular (1 ponto), e mutação JAK2^{V617F} (2 pontos). Os pacientes são classificados em três grupos; baixo risco (< 2 pontos), risco intermediário (= 2 pontos) e alto risco (≥ 2 pontos) (Tabela 6) (BARBUI et al., 2012) (TEFFERI et al., 2017).

Tabela 6 - Estratificação de risco e escore de risco de eventos de trombose em trombocitose essencial (IPSET).

Fatores	Pontuação
Idade > 60 anos	1 pontos
Histórico prévio de trombose	2 pontos
Risco cardiovascular	1 ponto
Mutação JAK2V617F	2 pontos
Estratificação de risco	Escore
Baixo	< 2
Intermediário	= 2
Alto	≥ 2

IPSET-trombose (escore prognóstico internacional de trombose para TE): os parâmetros são idade > 60 anos (1 ponto), histórico prévio de trombose (2 pontos), risco cardiovascular (1 ponto), e mutação JAK2V617F (2 pontos), os pacientes são classificados em três grupos; baixo risco (< 2 pontos), risco intermediário (= 2 pontos) e alto risco (≥ 2 pontos).

O quadro clínico da MFP é o mais agressivo dentre as NMP clássicas, e a qualidade de vida dos pacientes é comprometida por anemia, esplenomegalia e sintomas constitucionais. Os pacientes apresentam um risco maior de morte prematura ocasionada por complicações como infecção, sangramento, trombose, hipertensão portal e progressão para LMA. Os escores prognósticos que definem sobrevida para a MFP são o IPSS (*Internacional Prognostic Scoring System*), o DIPSS e DIPSS-PLUS (*Dynamic Internacional Prognostic Scoring System*). As variáveis comuns aos três escores prognósticos de MFP são: idade > 65 anos, hemoglobina < 10g/L, leucócitos > 25 x 10^9/L, blastos circulantes ≥ 1% e sintomas constitucionais. O escore DIPSS-PLUS considera três variáveis adicionais: transfusão sanguínea, plaquetas < 100 x 10^9/L e alteração no cariótipo. Os escores GIPSS (*Genetically Inspired Prognostic Scoring System*) e o MIPSS70 e MIPSS70-PLUS (*Mutation – Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation- Age*) incluíram os fatores de risco molecular e citogenético e a características morfológicas da MFP pré-fibrótica. O risco (escore) depende do número de fatores adversos apresentado pelo paciente 0, 1, 2 e ≥ 3, assim, os grupos são estratificados em: baixo, intermediário -1, intermediário -2 e alto risco (CERVANTES et al., 2009) (TEFFERI et al., 2012) (GANGAT et al., 2011) (TEFFERI et al., 2018) (GUGLIELMELLI et al., 2018) (PASSAMONTI et al., 2010).

Tabela 7 - Estratificação de risco e escore prognóstico em mielofibrose primparia.

Fatores	IPSS	DIPSS	DIPSS PLUS
Idade > 65 anos	1	1	1
Sintomas constitucionais	1	1	1
Hemoglobina < 10g/dL	1	2	1
Leucócitos >25x 10^9/L	1	1	1
Blastos no SP ≥ 1%	1	1	1
Plaquetas < 100 x 10^9/L			1
Transfusão			1
Alteração cariótipo			1
Estratificação de risco	**Escore**		
Baixo	0	0	0
Intermediário - 1	1	1 – 2	1
Intermediário -2	2	3 - 4	2 – 3
Alto	≥3	5-6	≥4

IPSS (*Internacional Prognostic Scoring System*), o DIPSS e DIPSS-PLUS (*Dynamic Internacional Prognostic Scoring System*). Esses três sistemas utilizam cinco variáveis para predizer a sobrevida: idade > 65 anos, hemoglobina < 10g/dL, leucócitos > 25 x 10^9/L, blastos circulantes ≥ 1% e sintomas constitucionais. O escore DIPSS – plus considera três variáveis adicionais, transfusão sanguínea, plaquetas < 100 x 10^9/L e alteração no cariótipo. O risco (escore) depende do número de fatores adversos apresentado pelo paciente 0,1,2 e ≥ 3, assim, os grupos são estratificados em: baixo, intermediário -1, intermediário -2 e alto risco.

1.1.5 Mutações não recorrentes nos genes TET2 e TERT em NMP BCR::ABL1-negativas clássicas

As mutações de reguladores epigenéticos são comuns em neoplasias hematológicas e o sequenciamento de todo o exoma revelou mutações recorrentes em TET2, DNMT3A ou ASXL1 em alguns casos de LMA e SMD. As modificações epigenéticas, metilação do DNA ou metilação/acetilação de histonas desempenham um papel fundamental na proliferação e diferenciação celular e contribuem para a função aberrante das células tronco e ao processo de tumorigênese (MARTÍNEZ-AVILÉS et al., 2014) (HAN; AN; KO, 2015).

A família de proteínas TET (ten – eleven – translocation) é composta por três membros, TET1, TET2 e TET3 que são dioxigenases conservadas evolutivamente, esses genes estão localizados nas regiões cromossômicas 10q21, 4q24 e 2q13, respectivamente. Análises estruturais revelaram características comuns compartilhadas entre os membros da família TET, como a região C – terminal que abriga o domínio catalítico da β-hélice dioxigenase de fita dupla (DSβH); denominado de domínio funcional da proteína. Esse domínio DSβH contém importantes resíduos de ligação para o Fe (II) e para α -cetoglutarato (α – KG) extremamente necessário para a sua função catalítica da proteína. No meio da proteína TET, pouco antes do domínio DSβH, reside o domínio rico em cisteína (Cys). A região amino (N) - terminal das

proteínas TET1 e TET3 possui uma região evolutivamente conservada, denominada domínio CXXC, que é crítico para ligação a resíduos de citosina não metilados no DNA. A proteína TET2 não possui o domínio CXXC, acredita-se que esse domínio se separou durante a evolução, e se tornou um gene independente chamado IDAX que está localizado na extremidade 5'do gene TET2. Assim, o papel do domínio CXXC é ser responsável pela ligação direta (TET1 e TET2) ou indireta (TET2) ao DNA.O gene IDAX regula negativamente a atividade de TET2, facilitando sua degradação. Resumidamente, o processo de desmetilação do DNA ocorre através da enzima TET que usa a molécula de oxigênio como um substrato para catalisar a descarboxilação oxidativa de α – KG, o qual gera Fe (IV) ligado a enzima, metilcitosina dioxigenase, essa catalisa a conversão de 5 – metilcitosina (5 - mC) para 5 – hidroximetilcitosina (5 – hmC), que desempenha um papel fundamental na expressão gênica (FENG et al., 2019)(NAKAJIMA; KUNIMOTO, 2014)(CHIBA, 2017).

As mutações em TET2 são frequentes em diversas neoplasias hematológicas, por exemplo, mastocitose sistêmica, NMP não classificada, LMMC, SMD, SMD/NMP, LMA e neoplasias mieloides com alteração cromossômica idic(X)(q13). Nas NMP a mutação TET2 é do tipo frameshift, nonsense e missense sendo frequente em 16% dos pacientes com PV, 5% em TE, 17% em MFP,14% em MF pós – PV e pós- TE e em 17 % dos pacientes com NMP fase blástica. Essas alterações no gene TET2 resultam na redução nos níveis de 5-hmC, indicando que a função TET2 foi alterada. Além disso, as mutações em TET2 coexistem com outras mutações relevantes como MPL, KIT, FLT3, RAS, MLL, CEBPA e NPM1 (OGURA et al., 2017).

A identificação de mutações não recorrentes fornece uma melhor compreensão sobre a patogênese complexa da NMP que é influenciada por fatores genéticos e ambientais. O material genético dos organismos eucariotos é organizado em fita dupla de DNA complementar, e a região conhecida como telômeros compreende estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos, sendo responsáveis pela fusão, rearranjo e estabilidade estrutural dos cromossomos. Os telômeros são uma estrutura proteica complexa que consiste em seis proteínas associadas: fatores de ligação à repetição telomérica 1 e 2 (TRF1 e TRF2) que se ligam ao DNA telomérico de fita dupla por meio de seus domínios MYC C- terminal; RAP1 (TRF2 interacting protein 1) que é recrutado através de sua interação com TRF2 e se liga ao DNA na fita dupla e fita simples junção do telômero; POT1 (proteção de telômeros) que forma um heterodímero com TPP1 (POT1 e TIN2 proteina de interação 1) e se liga especificamente ao DNA telomérico de fita simples; e TRF1- fator nuclear de interação 2(TIN2) interagindo

com TRF1, TRF2 e POT1/TPP1 e, portanto, sendo essencial para a montagem de todo o complexo (BRUEDIGAM; LANE, 2016)

A ativação das vias de manutenção dos telômeros tem sido considerada como um marcador para o diagnóstico do câncer, e para o desenvolvimento das neoplasias hematológicas como MFP e TE. O encurtamento telomérico é um processo dinâmico, que acontece naturalmente durante o processo replicativo da célula, fatores adicionais podem causar perda de telômeros como espécies reativas de oxigênio, hormônios, e fatores de crescimento. O primeiro sinal do encurtamento telomérico é o processo de senescência celular, um estado celular não proliferativo irreversível, e posteriormente, ocorre o processo de apoptose (PESTANA et al., 2017)(DRATWA et al., 2020).

A maioria das células com capacidade replicativa de longo prazo como células germinativas, células tronco embrionárias e células tronco e progenitoras presentes nos centros germinativos de células B e T, produzem telomerase. A telomerase é uma polimerase de DNA dependente de RNA e tem como principal componente catalítico a transcriptase reversa da telomerase (TERT), que mantém o comprimento adequado dos telômeros adicionando sequências teloméricas repetidas, sequências em tandem TTAGGG, às extremidades 3’ do DNA, catalisando a reação de síntese dos telômeros. A holoenzima telomerase consiste em duas cópias da enzima transcriptase reserva (TERT), RNA componente (TERC) e discernia, uma proteína de estabilização. A proteína TERT é silenciosa na maioria das células normais devido a repressão transcricional, e em aproximadamente 80-90% dos casos a indução da proteína TERT está associada à ativação da telomerase que é necessária para a transformação maligna, as células tronco superexpressam patologicamente a telomerase permitindo a imortalidade replicativa. Um pequeno, mas importante subconjunto de células neoplásicas estende seus telômeros por mecanismos independentes da telomerase, esse processo é conhecido como alternativa de alongamento dos telômeros (ALT). Isso é mais comum em tumores mesenquimais originários de ossos, tecidos moles e sistema nervoso. A telomerase também cumpre funções de sinalização, como Wnt-β catenina, NFkB, processamento de RNA mitocondrial, transcrição de DNA ribossômico e reparo de danos ao DNA (BRUEDIGAM; LANE, 2016)

Os mecanismos subjacentes à reativação da telomerase na oncogênese estão atualmente sendo investigados, a edição do genoma da região promotora TERT revelou falha no silenciamento da expressão TERT em células tronco pluripotentes humanas ao se diferenciar em células somáticas, resultando em telômeros aberrantemente longos. No estudo de associação genômica algumas variantes do gene TERT aumentaram a suscetibilidade ao glioma, desde

então, as variantes TERT têm sido associadas a vários tipos de câncer, incluindo mama, pulmão, colorretal, ovário, próstata, gástrico, mieloma múltiplo, linfoma, trombocitemia essencial e LMA (PESTANA et al., 2017)

Nas neoplasias hematológicas, o encurtamento do comprimento dos telômeros é acelerado em razão do aumento da proliferação, e esse fato se correlaciona com progressão mais rápida da doença, resposta reduzida à quimioterapia e prognóstico ruim (LI et al., 2017).

1.1.6 Variantes germinativas em NMP BCR::ABL1- negativas clássicas

A predisposição genética para a ocorrência de NMP foi compreendida através de grandes estudos epidemiológicos, estima-se que 5-10% dos pacientes com NMP representam casos familiares. As mutações em genes da linhagem germinativa predispõem para o risco de desenvolver alguma NMP, influenciando o desenvolvimento, fenótipo ou a severidade dessas doenças. As variantes genéticas constitucionais que predispõe às NMPs podem ser classificadas em 2 grupos: (1) variantes comuns, prevalentes na população, que resultam em uma pequena predisposição à NMP; e (2) variantes raras, frequentemente encontradas em NMPs familiares, que resultam em uma maior predisposição à NMP (TAPPER et al., 2015)(VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

O haplótipo GGCC ou 46/1 no lócus JAK2 predispõe a NMP JAK2^{V617F} esporádica e familiar. Recentemente, foi relatado que a variante da sequência germinativa TERT rs2736100 A>C, previamente associado com tumores sólidos, especialmente câncer de pulmão, emergiu como outro polimorfismo que contribui para NMP (Szuber e Tefferi, 2017) (MATSUGUMA et al., 1234) (Trifa et al., 2018). Tapper e colaboradores reportaram três outros polimorfismos que podem predispor NMP: JAK2 rs12339666 e rs2201862 em NMP JAK2^{V617F} - negativo e HBS1L/MYB rs9376092, que se correlaciona especialmente com TE JAK2^{V617F} - positivo e NMP com presença de mutação em MPL e CALR (TAPPER et al., 2015).

Shen e colaboradores analisaram 181 pacientes com diagnóstico de NMP JAK2^{V617F} positivos e 236 pacientes saudáveis e notaram que a frequência do genótipo TET2 rs3733609 C/T é maior em pacientes com NMP JAK2^{V617F} positivos do que em populações controle, e sugeriram que o alelo C pode ser um alelo de predisposição da NMP JAK2^{V617F}. Pacientes com o genótipo TET2 rs3733609 C/T quando comparando com o genótipo T/T, apresentam contagem elevada de leucócitos, plaquetas e hemoglobina, aumento da celularidade da medula

óssea, maior ocorrência de hepatoesplenomegalia e eventos trombóticos, indicando que o genótipo C/T contribui para hematopoese mieloide na NMP (SHEN et al., 2016).

Analisando amostras de células mononucleares de medula óssea de pacientes com NMP, os autores observaram que a expressão de RNAm de TET2 para o genótipoTET2 rs3733609 C/T é reduzida em 71% quando comparado aos genótipos T/T, sugerindo que o genótipo TET2 rs3733609 C/T regula a transcrição de RNAm de TET2, e a variante C nessa posição regula negativamente a expressão de TET2. Células expressando TET2 rs3733609 C/T apresentam maior número de colônias de BFU-E em ensaio de proliferação de colônias eritróides *in vitro* comparado às células expressando TET2 rs3733609 T/T. Essas observações sugerem que as células progenitoras dos pacientes com NMP $JAK2^{V617F}$ e genótipo C/T apresentam um potencial proliferativo para a hematopoese eritroide (SHEN et al., 2016).

A região cromossômica 5p15.33 apresenta vários polimorfismos, mas em 2008, McKay e colaboradores associaram o polimorfismo TERT rs2736100 com o câncer de pulmão, desde então, vários estudos analisaram e comprovaram a relação do polimorfismo TERT rs2736100 com neoplasia pulmonar e outros tumores sólidos (NIE 2014, PENG 2015). O polimorfismo TERT rs2736100 está associado com o desenvolvimento de tumores sólidos em pacientes com NMP, independentemente da terapia citorredutora (KRAHLING 2016).

Trifa e colaboradores publicaram em 2015 um estudo que caracterizou a contribuição do polimorfismo TERT rs2736100 na ocorrência de NMP BCR::ABL1- negativas clássicas, a coorte de estudo inclui 529 pacientes com NMP e 433 controles. A variante em homozigose (CC) e em heterozigose (AC) do polimorfismo TERT rs2736100 foi mais frequente nos casos de NMP $JAK2^{V617F}$ - positiva e NMP mutados para CALR. Essas observações foram verdadeiras ao se restringir as análises a cada entidade de NMP BCR::ABL1-negativas clássicas, PV, TE e MFP JAK2V617F positivo e TE e MFP com mutação em CALR. Os parâmetros como idade, sexo, eventos trombóticos, mielofibrose secundária, índices hematimétricos (hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas) não tiveram correlação com a presença dos genótipos CC e AC (TRIFA 2015).

Os pacientes suíços e chineses que carregam o TERT rs2736100 genótipo CC apresentam um maior risco para o desenvolvimento NMP quando comparado com os pacientes com TERT rs2736100 genótipo AA, e TERT rs2736100 genótipo CC foi associado ao sexo masculino. A expressão de TERT foi maior em pacientes com NMP e TERT rs2736100 genótipo CC comparados com pacientes com o TERT rs2736100 genótipo AC. Nas coortes de pacientes suíços e chineses, o alelo C do polimorfismo TERT rs2736100 mostrou ser um alelo

de risco para NMP em homens, e a menor incidência de NMP na população chinesa está correlacionada com a menor frequência de alelo de risco C (DAHLSTRÖM et al., 2016).

Os polimorfismos TET2 rs3733609 e TERT rs2736100 foram associados com a predisposição de NMP com base em coortes de pacientes caucasianos, essa descoberta fornece informações significativas sobre a suscetibilidade genética das NMP. Os achados indicam a relevância do estudo dos polimorfismos em TET2 e TERT e o risco de desenvolver NMP assim como a associação dos polimorfismos com as características clínicas e desfechos dos pacientes caucasianos com NMP (LI et al., 2017)(TRIFA et al., 2016)(SHEN et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e descrever as características demográficas, clínicas, laboratoriais, citogenéticas e moleculares, a frequência e o impacto clínico dos polimorfismos TET2 rs3733609 e TERT rs2736100 nos pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas: PV, TE e MFP do HC FMRP USP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a coorte de pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas em seguimento no HC FMRP USP, quanto aos aspectos demográficos, clínicos, citogenéticos e moleculares;

- Investigar a frequência e o impacto clínico do polimorfismo TET2 rs3733609 na coorte de pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas;

- Investigar a frequência e o impacto clínico do polimorfismo TERT rs2736100 na coorte de pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O projeto de pesquisa incluiu 245 pacientes com diagnóstico de NMP BCR::ABL1-negativa em seguimento no HC FMRP USP, entre dezembro de 2006 a dezembro de 2019. Dados demográficos e clínicos foram obtidos do prontuário médico: idade, gênero, parâmetros hematimétricos, visceromegalias (exame físico), mielograma, biópsia de medula óssea, mutação JAK2, CALR e MPL, presença de eventos tromboembólicos e resultado do exame de citogenética.

O diagnóstico definitivo dos pacientes foi confirmado com base em dados clínicos e laboratoriais de hemograma, mielograma, biópsia de medula óssea e biologia molecular, e seguiu os critérios recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) 2017. O diagnóstico foi revisado pela discente sob supervisão da orientadora e um terceiro médico de forma independente. Para os casos em que houveram incertezas ou discordâncias, uma revisão anátomo-clínica foi realizada em conjunto com o Docente responsável pelo serviço de patologia para doenças hematológicas do HC FMRP USP.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa do HCFMRP-USP (Anexo I) e o termo de consentimento foi aplicado e obtido dos participantes.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS PARA EXAME DE CITOGENÉTICA

As amostras de medula óssea foram coletadas como procedimento de rotina no atendimento dos pacientes em seringa estéril (20 ml) contendo 1 a 2 ml de anticoagulante heparina com um volume final total de 3 a 5 ml sendo transportado em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a contagem de células, sendo que 1 x 10^7 células foram semeadas em 10 mL de meio RPMI (Vitrocell, SP, BR) com 20% de soro fetal bovino (GIBCO, SP, BR) e 1% Streptomicina (GIBCO, SP, BR) e mantidas em estufa de CO2 à 37ºC por 24 e 48 horas.

Completado o tempo de cultura, 100 µL do inibidor de mitose Colcemid (KaryoMax [GIBCO, NY, EUA) foram adicionados à cultura, e após 30 minutos de incubação em estufa de CO2 à 37°C, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi desprezado. Após essa etapa, as amostras foram submetidas à hipotonização (KCl 0,075 M), o protocolo preconiza a ressuspensão e incubação das amostras em um volume de 10 mL da solução hipotônica por 16 minutos, seguida de homogeneização em agitador vortex. O material foi submetido a três etapas de lavagem e fixação em solução de Cannoy (ácido acético e metanol na proporção de 3: 1). Para o bandeamento G, as lâminas foram imersas em tripsina (GIBCO, NY, EUA), seguidas de tampão fosfato e coloração em Wright's eosine methylene blue (MERCK, Darmstadt, Alemanha). Finalizado o bandeamento, as metáfases foram visualizadas no microscópio óptico (ZEISS AXIO) e analisadas no programa de captura de imagem Applied Spectral Imaging. Sempre que possível, 20 metáfases foram analisadas, e o resultado do cariótipo seguiu a nomenclatura de acordo com o Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN 2017 - An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016) Ed. McGovan-Jordan J., Simons A, Schmid M. Karger,2017). Apenas os exames coletados a partir de junho de 2013 foram considerados; a discente responsável realizou e/ou revisou todas as análises citogenéticas, sob supervisão da orientadora, dos exames incluídos no presente trabalho.

3.3 OBTENÇÃO DE DNA DE PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS

O processamento das amostras de sangue periférico para a obtenção do DNA foi realizado com o Kit Gentra Puregene Blood (Qiagen) de acordo com orientações do fabricante. Resumidamente, foi utilizada solução de lise de hemácias, solução de lise de glóbulos brancos e solução de precipitação de proteína para retirada dos restos celulares. Posteriormente, foi usado isopropanol para precipitação do DNA e solução de hidratação de DNA para reconstituição do precipitado. Todos os pacientes foram submetidos a coleta de sangue periférico para extração de DNA e pesquisa de mutação $JAK2^{V617F}$ como teste de rotina diagnóstica. Amostras de DNA remanescentes foram utilizadas para a investigação dos polimorfismos TET2 rs3733609 e TERT rs2736100. A integridade e a concentração do DNA remanescente da coorte de estudo foram verificadas através da leitura em aparelho Nano Vue (GE). As amostras que apresentaram razões de absorbância A260/A280 e A260/A230 entre 1.8 e 2.0, e concentração igual ou maior que 100 ng/uL, foram consideradas quantitativa e

qualitativamente apropriadas para as análises moleculares. As amostras de DNA foram diluídas para concentração de 50 ng/uL e armazenadas a - 20ºC até o momento da realização do PCR em tempo real.

3.4 ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS TET2 RS3733609 E TERT RS2736100

A presença dos polimorfismos TET2 rs3733609 e TERT rs2736100 foram avaliados através da técnica de qPCR (do inglês, Real-Time Quantitative PCR), utilizando o equipamento PCR Real-Time – Applied Biosystems 7500 FAST (Applied biosystems, EUA) e a metodologia TaqMan® MGB Probes. A discriminação alélica é realizada através de sondas de hidrólise, oriunda da liberação e ativação de um fluorocromo ligado a uma sonda de hidrólise específica para cada alelo do polimorfismo de interesse. Na análise do polimorfismo TET2 rs3733609 a sonda utilizada foi C__25994807_10 (Thermo Fisher Scientific), na qual o fluorocromo VIC está ligado ao alelo 1 (C) e o fluorocromo FAN ligado ao alelo 2 (T). Na análise do polimorfismo TERT rs2736100, a sonda utilizada foi C___1844009_10 (Thermo Fisher Scientific), na qual o fluorocromo VIC está ligado ao alelo 1 (A) e o fluorocromo FAN ligado ao alelo 2 (C) (Tabela 8). O master mix do qPCR foi preparado de acordo com as orientações do fabricante: 2 uL de DNA em uma concentração de 50 ng/uL, 0,5 uL de sonda específica (20x), 5 uL do master mix, 2,5 uL de água livre de nuclease; volume final de 10 uL por reação. Em cada poço da placa foi adicionado 10 uL do master mix, a placa foi selada com filme adesivo, agitada em vortex em alta velocidade por duas vezes, centrifugada a 1200 x g durante 1 minuto. A placa foi colocada no termociclador conforme orientação do fabricante: 95ºC por 20 segundos para desnaturação inicial, seguida de 50 ciclos de desnaturação a 95º C por 3 segundos e anelamento e extensão a 60º C por 30 segundos.

Tabela 8 - Correlação do sinal de fluorescência.

Fluorescência	Sinal
VIC	Homozigoto alelo 1
FAN	Homozigoto alelo 2
VIC/FAN	Heterozigoto alelo 1 e 2

Correlação dos fluorocromos VIC e FAN com alelos polimorfismo de interesse

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 9 (GraphPad Prism Software, Inc., CA, EUA). As variáveis contínuas foram comparadas utilizando os testes de t–student ou Mann–Whitney, enquanto que para as variáveis categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher ou Chi-quadrado. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS CLÁSSICA

De um total de 245 pacientes com diagnóstico de NMP BCR::ABL1-negativas clássica, 72 (29%) pacientes foram diagnosticados com PV, 54 (22%) com TE e 119 (49%) com MFP. A idade mediana foi de 73 anos, e a distribuição foi similar entre homens e mulheres, sendo 123 pacientes do sexo masculino e 122 pacientes do sexo feminino. As principais características demográficas, clínicas, laboratoriais, citogenéticas, moleculares e desfechos da coorte estão indicadas na Tabela 9.

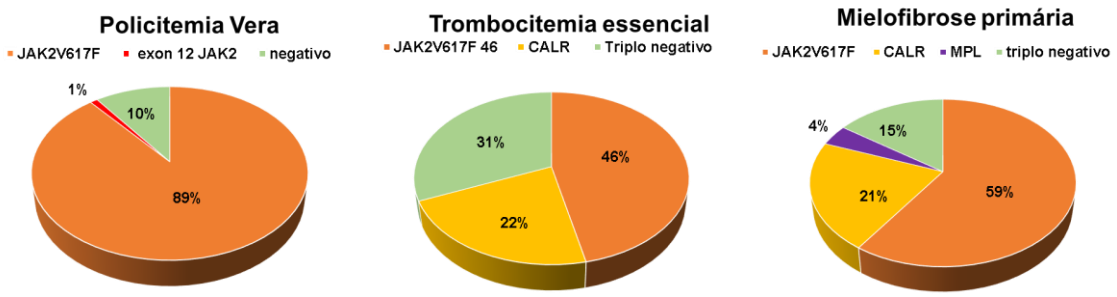
Para a coorte de 245 pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas, as mutações em JAK2^{V617F}, JAK2 exon 12, CALR exon 9 e MPL exon 10 foram observadas em 160 (65%), 1 (0,4%), 37 (15%) e 6(2%), respectivamente. Para a coorte de 72 pacientes com PV, as mutações JAK2^{V617F} e JAK2 exon 12 foram observadas em 64 (89%) e 1 (1%), respectivamente. Oito pacientes com PV não foram analisados para a mutação em JAK2, por indisponibilidade de amostra viável para a pesquisa, sendo definidos com base nos critérios clínicos estabelecidos pela OMS. Para a coorte de 54 pacientes com TE, as mutações em JAK2^{V617F}, CALR exon 9 e MPL exon 10 foram observadas em 25 (46%), 12 (22%), 1 (2%), respectivamente. Dezesseis pacientes com TE foram triplo negativos. Para a coorte de 119 pacientes com MFP, as mutações em JAK2^{V617F}, CALR exon 9 e MPL exon 10 foram observadas em 71 (60%), 25 (21%), 5 (4%), respectivamente. Dezoito pacientes com MPF foram triplo negativos (**Erro! Fonte de eferência não encontrada.**).

Tabela 9 - Características demográficas e clínicas de pacientes com NMP clássica: PV, TE e MFP.

	NMP n = 245 n (%)	PV n = 72 n (%)	TE n = 54 n (%)	MFP n = 119 n (%)
Sexo				
Feminino	122 (50)	39(54)	33(61)	50(42)
Masculino	123 (50)	33(46)	21(39)	69(58)
Idade				
≥60	191 (78)	55(76)	34(63)	102(86)
Risco cardiovascular				
Tabagismo	59 (24)	15(21)	14(26)	30(25)
HAS	146 (60)	50(69)	34(63)	62(52)
Diabetes	38 (16)	14(19)	10(18)	14(12)
Esplenomegalia	73 (30)	17(24)	3(6)	53(45)
Hemorragia	4 (2)	0	1(2)	3(3)
Trombose	89 (36)	33(46)	17(31)	39(33)
Exames laboratoriais				
Hb(g/dl)1	14,2 (6 -23,7)	17,80(16,10– 23,70)	13,90(8,50- 16,50)	11,90(6,0- 22,40)
≥ 16 g/dL	82 (33)	71(99)	4(7)	7(6)
< 10 g/dL	30 (12)	0	1(2)	29(24)
Ht (%)[1]	43 (17-76)	55,0(48,0 - 76,0)	41,50(26,0– 53,0)	37,0(17,0– 66,8)
> 48%	77 (31)	69(96)	4(7)	4(3)
Leucócitos ($x10^9/L$)[1]	10,5 (0,7-86,5)	10,8 (4,0 – 35,0)	8,7 (3,20 – 20,0)	12,2(0,7– 86,5)
> 25	25 (10)	2(3)	0	23(19)
≥ 11	113 (46)	34(47)	10(8)	69(58)
Neutrófilo ($x10^9/L$)[1]	7,2 (0,6 – 7,8)	7,4 (2,2 -24,6)	5,9 (1,7 – 15,0)	8,3 (0 – 73,5)
% blastos SP[1]	1 (0- 10)	0	3 (3 – 3)	1 (0 -10)
Plaquetas ($x10^9/L$)[1]	741 (179 -2614)	441(70 – 1355)	941(453 – 2466)	722(179– 2614)
≥450	171 (70)	34(47)	53(98)	84(71)

< 100	15 (6)	1(1)	0	14(12)
% blastos MO[1]	49 (0 -49)	2 (1 – 5)	1,5 (1 – 49)	2 (0 – 17)
LDH U/L[1]	575 (182– 6274)	513 (182 -1602)	429,50 (264,61 – 4888)	773,87 (239,95- 6274)
Colesterol (mg/dl) [1]	166(31,95 -509,29)	167,39(90,15 – 400)	183,31(85,18 – 309,14)	157,22(31,95– 509,29)
Triglicerídeos (mg/dl) [1]	126,25(37,87-854)	117,49(37,87– 577,46)	116,0(41,94– 550,04)	147,23(39,77 -854)
Cariótipo				
Favorável	106 (43)	33(46)	25(46)	48(40)
Intermediário	18 (7)	4(6)	3(6)	11(9)
Mutações JAK/STAT				
JAK2V617F	160 (65)	64(89)	25(46)	71(60)
JAK2 exon 12	1 (0,4)	1(1)	0	0
CALR exon 9	37 (15)	0	12(22)	25(21)
MPL exon 10[3]	6 (2)	0	1(2)	5(4)
Terapia				
Transfusão CH	38 (15)	1(1)	4(7)	33(28)
Hidroxiuréia	170 (70)	62(86)	44(81)	64(54)
AAS	159 (65)	57(80)	43(80)	59(50)
TCTH alogênico	6 (2)	0	0	6(5)
Evolução para LMA	7 (3)	2(3)	2(4)	3(3)
Óbito	35 (14)	7(10)	2(4)	26(22)

Figura 2 - Frequência de mutações recorrentes na coorte de pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas



Frequência de mutações recorrentes nos genes da JAK2, CALR e MPL na coorte de 245 pacientes com neoplasias mieloproliferativas BCR::ABL1-negativas clássicas. A presença da mutação no gene da *JAK2* foi observada em 161 sendo 65 (90%) pacientes com PV, 25 (46%) com TE e 71 (59%) com MFP. A presença da mutação em CALR foi observada em 12 (22%) com TE e 25 (21%) com MFP. A mutação no gene MPL foi observada em 5 (4%) pacientes com MFP. No grupo de pacientes com TE e MFP 17 (31%) e 18 (15%) foram triplo negativos.

A avaliação citogenética foi realizada em 124 (50%;124/245) pacientes. A ausência de metáfases ocorreu em 61 (25%; 61/245) dos casos, e não foi realizado a análise citogenética em 60 (25%;60/245) pacientes, em razão da indisponibilidade de material para a citogenética. O cariótipo normal foi observado em 106 (86%;106/124) casos e alteração citogenética foi observada em 17 (14%;17/124) casos. Dentre os 17 casos com cariótipo alterado, 4 pacientes tiveram o diagnóstico de PV, 3 pacientes de TE e 10 pacientes de MFP. Dentre os pacientes com MFP, um paciente apresentou cariótipo complexo 45,XX,del(5)(q13q33),13[6]/46,idem,+mar[6]/46,XX,7,+mar[4]/45,idem,10[3]/46,XX[1] e a alteração mais comuns entre as 3 entidades foi a trissomia do cromossomo 8. A trissomia do cromossomo 8 (Figura 3), trissomia do cromossomo 9 (Figura 4) e a monossomia do cromossomo 7 (Figura 5). Outras alterações numéricas, estruturais e deleções foram observadas nos cromossomos 1,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,17 e 20 (Tabela 10 e Tabela 11).

Tabela 10 - Alterações citogenéticas observadas nos pacientes com diagnostico de NMP.

OMS	Citogenética
TE	47,XY,+12[3]/46,XY[17]
TE	47,XX,+8[2]/46,XX[15]
TE	47,XX,+8[4]/46,XX[16]
PV	47,XY,+8[16]/46,XY[4]
PV	47,XY,+8[10]/48,idem,+19[10]
PV	46,XX,t(3;10)(q21;q24)[2]/46,XX[18]
PV	47,XX,+9[20]
MFP	47,XY,+13[19]/46,XY[1]
MFP	46,XX,t(4;11)(q23;p15)[7]/46,XX[1]
MFP	45,XY,-7[12]/46,XY[8]

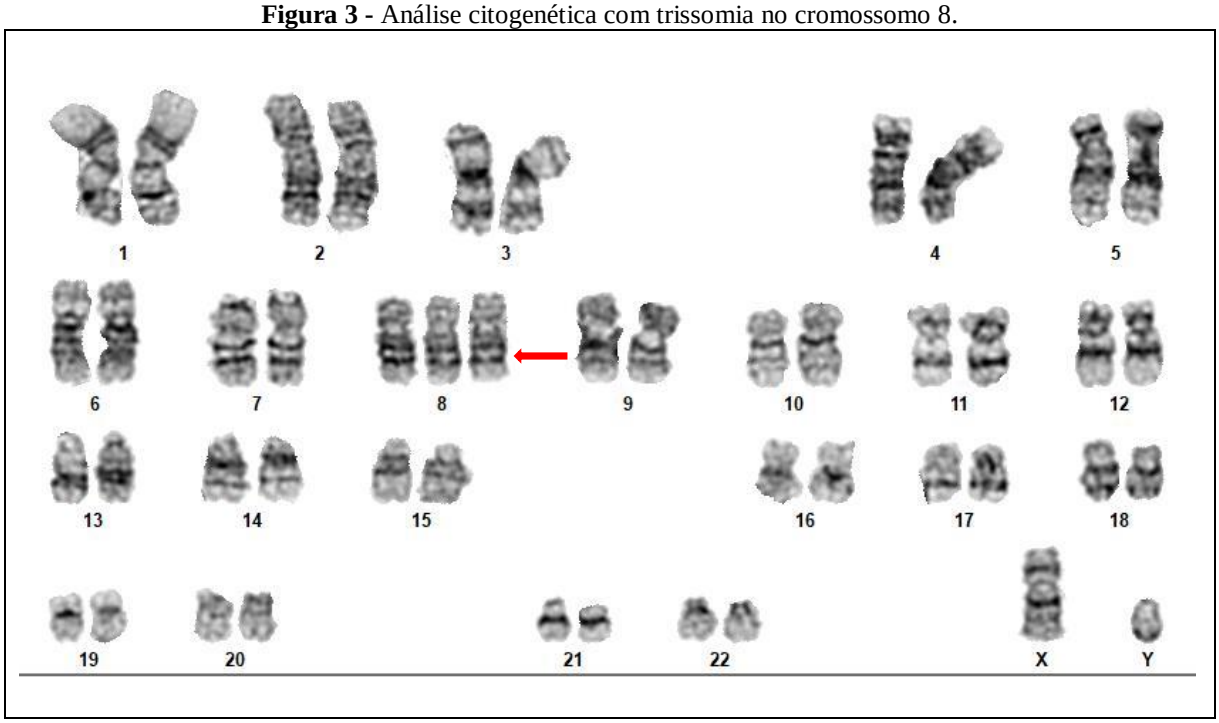
MFP	48,XX,+8,+mar[3]/48,XX,del(6)(p23),+8,+mar[17]
MFP	46,XY,del(20)(q11)[6]/46,XY[14]
MFP	46,XY,t(6;9)(q21q24;q31),-17 [26]//46,XX[1]
MFP	45,XX,del(5)(q13q33),-13[6]/46,idem,+mar[6]/46,XX,-7,+mar[4]/45,idem,-10[3]/46,XX[1]
MFP	47,XY,+9[3]/46,XY[17]
MFP	46,XX,dup(1)(q21q32)[17]/46,XX[3]
MFP	46,XX,del(20)(q13.1)[14]/46,XX[1]

Abreviações: OMS, Organização Mundial da Saúde; PV, policitemia vera; TE, trombocitemia essencial; MFP, mielofibrose primária.

Tabela 11 - Descrição das anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais definidas pela citogenética convencional.

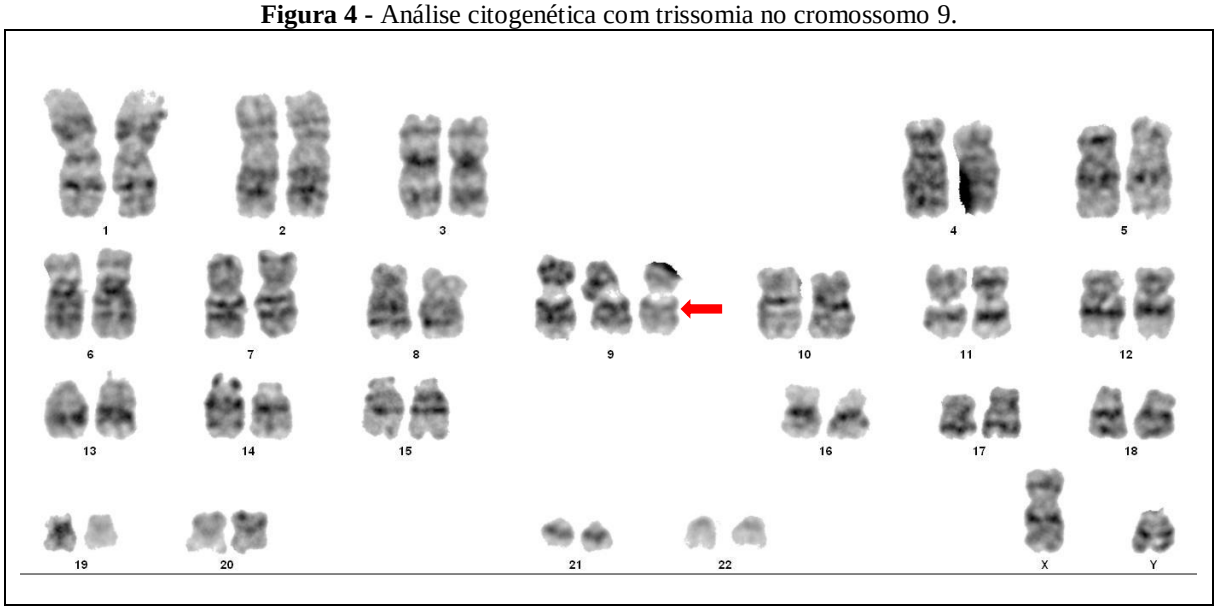
Cromossomo	Alteração	Número de pacientes
1	dup(1q)	1
3	t(3q)	1
4	t(4q)	2
5	del(5q)	1
6	del(6q)	1
	t(6q)	1
7	Monossomia 7	1
8	Trissomia 8	5
9	t(9q)	1
	Trissomia 9	2
10	t(10q)	1
11	t(11q)	1
12	Trissomia 12	1
13	Trissomia 13	1
	Monossomia 13	1
17	Monossomia 17	1
20	del(20q)	3

Figura 3 - Análise citogenética com trissomia no cromossomo 8.



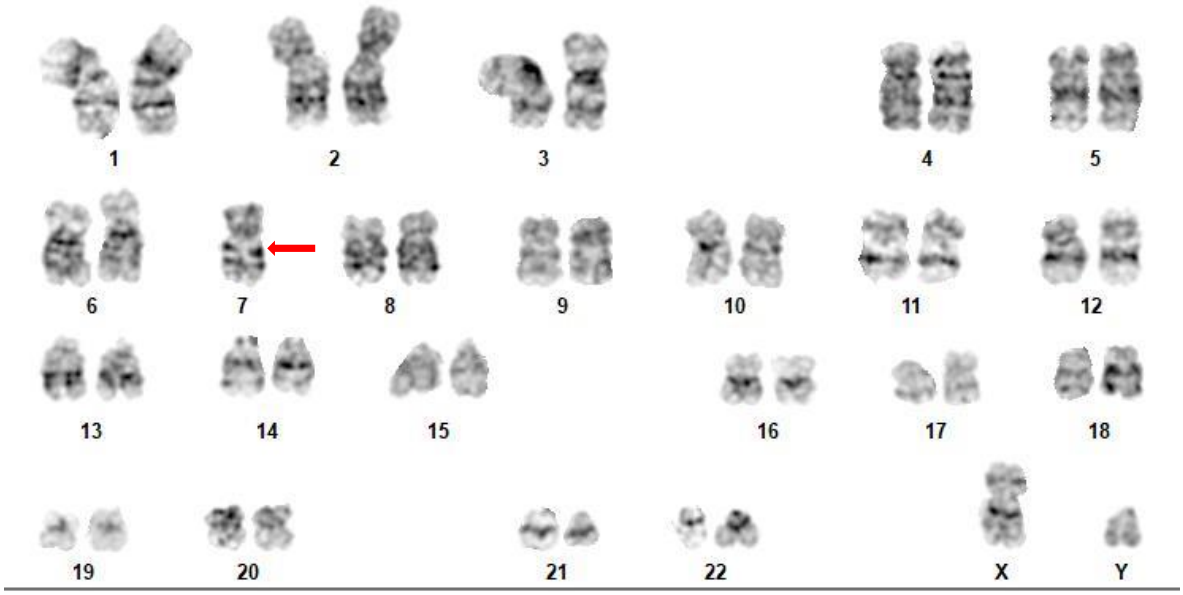
O cariótipo convencional indicou a trissomia 8: 47, XY,+8[16]/46,XY[4]. A seta indica o cromossomo 8.

Figura 4 - Análise citogenética com trissomia no cromossomo 9.



O cariótipo convencional indicou trissomia 9: 47, XY, +9[3] /46, XY [17]. A seta indica cromossomo 9.

Figura 5 - Análise citogenética com monossomia no cromossomo 7.



O cariótipo convencional indicou a monossomia 7: 45, XY, -7[12] /46, XY [8] A seta indica a ausência do cromossomo 7.

4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO TET2 RS3733609 C>T E O TERT RS2736100 A>C E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM NMP BCR::ABL1-NEGATIVAS

O polimorfismo TET2 rs3733609 foi investigado em 227 pacientes, sendo 69 pacientes com PV, 52 com TE e 106 com MFP. O genótipo homozigoto TT foi observado em 191 (84%;191/227), sendo 57 pacientes com PV, 45 com TE e 89 com MFP. O genótipo heterozigoto CT foi observado em 32 (14%; 32/227) pacientes, sendo 10 com PV, 6 com TE e 16 com MFP. O genótipo homozigoto CC foi observado em 4 (1,8%; 4/227) pacientes, sendo 2 com PV, 1 com TE e 1 com MFP. Trinta e seis pacientes (16%; 36/227) apresentam o alelo polimórfico C de TET2 rs3733609 (Tabela **12**).

Tabela 12 - Frequência genotípica e alélica de SNP TET2 rs3736609 C>T em neoplasia mieloproliferativa clássica.

	Frequência genotípica				Frequência alélica	
	TT n(%)	TC n(%)	CC n(%)	TC+CC n(%)	Alelo T	Alelo C
NMP, n= 227	191 (84)	32 (14)	4 (2)	36 (16)	0,91	0,09
PV, n=69	57 (83)	10 (14)	2 (3)	12 (17)	0,9	0,1
TE, n=52	45 (86)	6 (12)	1 (2)	7 (13)	0,92	0,08
MFP, n=106	89 (84)	16 (15)	1 (1)	17 (16)	0,91	0,08

O polimorfismo TERT rs2736100 foi avaliado em 242 pacientes, sendo 71 com PV, 53 com TE e 118 com MFP. O genótipo homozigoto CC foi observado em 90 (37%; 90/242) pacientes, sendo 31 com PV, 17 com TE e 42 com MFP. O genótipo heterozigoto CA foi observado em 119 (49%;119/242) pacientes, sendo 32 pacientes com PV, 26 com TE e 61 com MFP. O genótipo homozigoto AA foi observado em 33 (14%; 33/242) pacientes, sendo 8 pacientes com PV, 10 com TE e 15 com MFP. Cento e cinquenta e dois pacientes (63%;152/242) apresentaram o alelo polimórfico A de TERT rs2736100 (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência genotípica e alélica de SNP TERT rs2736100 C>A em neoplasia mieloproliferativa clássica.

	Frequência genotípica				Frequência alélica	
	CC n(%)	CA n(%)	AA n(%)	AC+CC n(%)	Alelo C	Alelo A
NMP, n= 242	90 (37)	119 (49)	33 (14)	152 (63)	0,62	0,38
PV, n=71	31 (44)	32 (45)	8 (11)	40 (56)	0,66	0,34
TE, n=53	17 (32)	26 (49)	10 (19)	36 (68)	0,57	0,43
MFP, n=118	42 (36)	61 (52)	15 (13)	66 (56)	0,61	0,39

Na coorte de pacientes com NMP clássicas, não houveram diferenças entre os grupos de pacientes com diferentes genótipos para o polimorfismo TET2 rs3733609 em relação aos dados demográficos (idade, gênero), laboratoriais (dosagem de hemoglobina, contagem de leucócitos, neutrófilos, blastos no SP, blastos na medula óssea, plaquetas e LDH), moleculares (mutações JAK2, CALR e MPL e risco citogenético), risco cardiovascular (tabagismo, hipertensão e diabetes), manifestações clínicas (esplenomegalia, hemorragia, trombose) e desfechos (evolução para LMA e óbito) (todos valores $p \geq 0,05$) (Tabela 14).

A avaliação do polimorfismo TERT rs2736100 na coorte de pacientes com NMP clássicas, evidenciou que pacientes com polimorfismo TERT rs2736100 CA + AA

apresentaram menor valor da mediana de hemoglobina (p=0,0036), hematócrito (p=0,0055), contagem de neutrófilos (p=0,032), menor frequência de mutações no gene da JAK2^{V617F} (p=0,025 e maior frequência de diabetes mellitus tipo 2 (p<0,0001) em comparação aos pacientes com SNP TERT rs2736100 CC (Tabela 15).

Não houveram diferenças entre os grupos de pacientes com diferentes genótipos para o polimorfismo TERT rs2736100, em relação a dados demográficos (idade, gênero), laboratoriais (contagem de leucócitos, blastos no SP, blastos na medula óssea, plaquetas e LDH), mutações no gene da CALR e MPL, risco citogenético, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, principias manifestações clinicas da doença (esplenomegalia, hemorragia, trombose) e desfechos (evolução para LMA e óbito) (todos valores $p \geq 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Características demográficas e clínicas de pacientes com NMP e polimorfismo em TET2 rs3736609 e TERT rs2736100.

	TET2 *rs3736609*					TERT *rs2736100*				
	Total 227	TT n=191 n (%)	TC +CC n=36 n (%)	*P valor*	OR (95% CI)	Total 242	CC n=90 n (%)	CA+AA n=152 n (%)	*p valor*	OR (95% CI)
Sexo										
Feminino	113	93 (49)	20(56)	0,47*	0,76 (0,37-1,6)	119	49(54)	70(46)	0,23*	1,4(0,82-2,36)
Masculino	114	98 (51)	16(44)			123	41(46)	82(54)		
Idade - med (mín-máx)		73 (21 -97)	75 (31 -90)	0,92#			72 (26-96)	73 (21-97)	0,7#	
≥60	175	148 (77)	27 (75)	0,82*	1,14(0,50-2,62)	188	71(79)	117(77)	0,75*	1,18(0,59-2,1)
<60	52	43 (23)	9(25)			54	19(21)	35(23)		
Diagnóstico										
PV	69	57 (30)	12(34)			71	31(34)	40(26)		
TE	52	45 (23)	7(19)	0,84□		53	17(19)	36(24)	0,36□	
MFP	106	89 (47)	17(47)			118	42(47)	76(50)		
Risco cardiovascular										
Tabagismo										
Sim	54	46 (24)	8(22)	1*	1,1(0,47-2,6)	59	23(25)	36(24)	0,75*	1,1(0,6-2)
Não		146	28				67	116		
HAS										
Sim	137	113 (59)	24(67)	0,46*	0,72(0,34-1,5)	143	56(62)	87(57)	0,49*	1,2(0,7-2)
Não		78	12				34	65		
Diabetes										
Sim	37	29 (15)	8(11)	0,32*	0,62(0,25-1,5)	35	13(12)	128(16)	<0,0001*	0,9(0,4-1,8)
Não		162	28				77	24		
Esplenomegalia										
Sim	65	54 (28)	11(31)	0,84*	0,89(0,4 -1,9)	72	31(34)	41(27)	0,24*	1,4(0,8-2,4)
Não	162	137 (72)	25(69)			170	59(65)	111(73)		
Hemorragia										
Sim	4	4 (9)	0	1*	1,75(0,09-33)	4	0	4(3)	0,29*	0,18(0,009-3,4)
Não	223	187 (98)	36(100)			238	90 (100)	148(97)		

Trombose										
Sim	83	72 (38)	11(31)	0,45*	1,37(0,63-2,9)	89	29(32)	60(39)	0,27*	0,72(0,42-1,2)
Não	144	119 (62)	25(69)			153	61(68)	92(61)		
Exames laboratoriais										
Hemoglobina (g/dl)		14,3(6-23,7)	14,5(7,4-21,1)	0,76#			15,2(8-23,7)	13,9(6-22,7)	0,0036**	#
Hematócrito (%)		43(17-76)	45,5(25-62)	0,77#			45(22-76)	42(17-72)	0,0055**	#
Leucócitos ($x10^9$/L)		10,5(0,7-86,5)	10,5(3-78,5)	0,61♦			10,8(0,7-78,5)	10,1(1,9 -86,5)	0,096♦	
Neutrófilo ($x10^9$/L)		7,2(0-78,7)	7,1(1,4-58,5)	0,81♦			7,8(0,9-58,5)	6,8 (0,6 -78,7)	0,032*♦	
Blastos SP										
Sim	18	17(9)	1(3)	0,31*	3,4(0,44-26)	21	5(6)	16(11)	0,23*	0,5(0,17-1,4)
Não	209	174(91)	35(97)			221	85(94)	136(89)		
Plaquetas ($x10^9$/L)		717,5(1,79-2614)	705,5(84-2179)	0,57♦			721(22-1720)	705(2-2614)	0,91♦	
Blastos MO										
≥5%	11	10(5)	1(3)	1*	1,4(0,17-12)	11	1(1)	10(6)	0,05*	0,16(0,02-1,2)
<5%	148	129(68)	19(52)			157	60(67)	97(64)		
LDH U/L		558 (182 -6274)	645(333–4888)	0,33♦			625(266-4198)	557(182-6274)	0,17♦	
Cariótipo										
Favorável	101	88(46)	13(36)	1*	0,9(0,18-4)	103	37(41)	66(43)	0,2*	2,3(0,7-7)
Intermediário	17	15(8)	2(5)			21	4(4)	17(11)		
Mutação JAK2 ^{V617F}										
Sim	149	128(67)	21(58)	0,34*	1,4(0,7-3,0)	158	67(74)	91(60)	0,025*	1,9(1,1-3,4)
Não	78	63(33)	15(42)			84	23(26)	61(40)		
Mutação JAK/STAT										
Sim	32	25(13)	7(19)	0,77*	0,75(0,24-2,3)	43	13(14)	30(20)	0,8*	1,25(0,4-3,3)
Não	46	38(20)	8(22)			39	10(11)	29(19)		
Evolução para LMA										
Sim	7	5(7)	2(6)	0,3*	0,45(0,08-2,4)	7	2(2)	5(3)	1*	0,66(0,12-3,5)
Não	220	186(97)	34(94)			235	88(98)	147(97)		

Óbito										
Sim	32	27(14)	5(14)	1*	1(0,36-2,8)	35	14(15)	21(14)	0,7*	1,1(0,55-2,3)
Não	195	164(86)	31(86)			207	76(85)	131(86)		

O total de pacientes avaliados para a característica indicada é inferior ao total de pacientes avaliados para um dos polimorfismos avaliados.

*teste Fisher

teste t-student

☐ teste qui-quadrado

♦teste Mann- Whitney

4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O SNP TET2 RS3733609 C>T E O SNP TERT RS2736100 A>C E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM NMP E MUTAÇÃO JAK2^{V617F}

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes com mutação JAK2^{V617F} de acordo com os polimorfismos TET2 rs3733609 C>T e TERT rs2736100 A>C estão indicados na Tabela 15.

Na coorte de pacientes com NMP clássicas com mutação JAK2^{V617F}, a frequência de hipertensão arterial sistêmica foi maior no grupo de pacientes com polimorfismo TET2 rs3733609 TC + CC quando comparado com o grupo com polimorfismo TET2 rs3733609 TT (p=0,046) (Tabela 15).

A avaliação do polimorfismo TERT rs2736100 na coorte de pacientes com NMP clássicas com mutação JAK2^{V617F}, evidenciou que os valores da mediana para a hemoglobina foram menores em pacientes com SNP TERT rs2736100 CA + AA em comparação aos pacientes com SNP TERT rs2736100 CC (p=0,0025)

Não houve diferença entre os grupos de pacientes para os polimorfismos TET2 rs3733609 C>T e TERT rs2736100 A>C com relação a dados demográficos (idade, gênero), risco cardiovascular (tabagismo, diabetes) manifestações clínicas da doença (esplenomegalia, hemorragia, trombose) e desfechos (evolução para LMA e óbito) (todos valores $p \geq 0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Características demográficas e clínicas de pacientes com NMP mutação JAK2^{V617F} e polimorfismo TET2 rs3736609 e TERT rs2736100.

	TET2 *rs3736609*					TERT *rs2736100*				
	Total	TT n 128(%)	TC +CC n 21(%)	*P valor*	OR (95% CI)	Total	CC n 67(%)	CA+AA n 91(%)	*p valor*	OR (95% CI)
Sexo										
Feminino	81	68(53)	13(62)	0,48*	0,69(0,27-1,7)	86	37(55)	49(51)	0,62*	1,2(0,6-2,2)
Masculino	68	60(47)	8(38)			75	30(45)	45(49)		
Idade med (mín-máx)		74(26-96)	74(50-83)	0,92#			73(37-96)	74(26-93)	0,82#	
≥60	122	104(81)	18(86)	0,76*	0,72(0,19-2,65)	128	53(79)	77(85)	0,40*	0,68(0,30-1,56)
<60	27	24(19)	3(14)			28	14(21)	14(15)		
Diagnóstico										
PV	61	50(39)	11(52)			63	29(43)	34(37)		
TE	25	23(18)	2(10)	0,43□		24	10(15)	14(15)	0,60□	
MFP	63	55(43)	8(38)			71	28(42)	43(47)		
Risco cardiovascular										
Tabagismo										
Sim	38	33(26)	5(23)	1*	1,1(0,37-3,2)	41	18(27)	23(25)	0,85*	1(0,5-2,2)
Não	111	95	16				49	68		
HAS										
Sim	97	79(62)	18(86)	0,046*	0,2(0,07-0,9)	101	42(63)	59(65)	0,62*	0,8(0,4-1,6)
Não	52	49	3				27	32		
Diabetes										
Sim	23	18(14)	5(23)	0,32*	0,52(0,17-1,6)	23	8(12)	15(16)	0,49*	0,6(0,2-1,7)
Não	126	110	16				59	76		
Esplenomegalia										
Sim	44	37(29)	7(34)	0,79*	0,81(0,3-2,1)	50	21(31)	29(32)	1*	0,97(0,49-1,9)
Não	105	91(71)	14(66)			108	46(69)	62(68)		

Hemorragia										
Sim	3	3(2)	0	1*	1,1(0,05-24)	3	0	3(3)	0,26*	0,18(0,009-3)
Não	146	125(98)	21(100)			155	67(100)	88(97)		
Trombose										
Sim	62	54(42)	8(38)	0,81*	1,1(0,4-3)	66	23(34)	43(47)	0,14*	0,5(0,3-1,1)
Não	87	74(58)	13(62)			92	44(66)	48(53)		
Exames laboratoriais										
Hb (g/dl)		15,3(6,6-23,7)	16,2(7,4-21,1)	0,28#			15,55(8-23,7)	14,7(6,6-22,7)	0,0025#	
Ht (%)		46(14-73)	49(25-62)	0,33#			48(22-73)	45,9(17-72)	0,05#	
Leucócitos ($x10^9$/L)		11,04(1,9-86,5)	13,0(6,8-78,5)	0,38♦			12,2(2,4-78,5)	11,6(1,9-86,5)	0,12♦	
Neutrófilo ($x10^9$/L)		7,9(0,6-78,5)	9,4(4-58,5)	0,65♦			9(0,9-58,5)	7,75(0,6-78,7)	0,1♦	
Blastos SP										
Sim	10	10 (8)	0	0,35*	3,8(0,2-67)	14	3(5)	11(12)	0,15*	0,37(0,09-1,2)
Não	139	118 (92)	21(100)			144	64(95)	80(88)		
Plaquetas ($x10^9$/L)		667(49-2614)	711(124-2179)	0,29♦			733(63-1540)	627(49-2614)	0,43♦	
Blastos MO										
≥5%	4	4(3)	0	1*	1,1(0,05-22)	4	1(1)	3(3)	0,63*	0,43(0,04-4)
<5%	101	90(70)	11(52)			109	47(70)	62(68)		
LDH U/L		545(182-3377)	596(376-2505)	0,39♦			625(266-3377)	526,5(182-2388)	0,36♦	
Cariótipo										
Favorável	66	58(45)	8(38)	0,34*	0,27(0,014-5)	66	27(40)	39(43)	0,55*	1,5(0,4-5,5)
Intermediário	12	12(9)	0			13	4(6)	9(10)		

Evolução para LMA										
Sim	4	3(2)	1(5)	0,45*	0,48(0,04-4,8)	4	2(3)	2(2)	1*	1,3(0,18-9)
Não	145	125(98)	20(95)			154	65(97)	89(98)		
Óbito										
Sim	19	16(12)	3(14)	0,73*	0,85(0,22-3,2)	20	10(15)	10(11)	0,47*	1,4(0,05-3,6)
Não	130	112(88)	18(86)			138	57(85)	81(89)		

O total de pacientes avaliados para a característica indicada é inferior ao total de pacientes avaliados para um dos polimorfismos avaliados.

*teste Fisher

teste t-student

☐ teste qui-quadrado

♦teste Mann- Whitney

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE O SNP TET2 RS3733609 C>T E O SNP TERT RS2736100 A>C E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM PV, TE E MFP

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes com PV, TE e MFP de acordo com os polimorfismos TET2 rs3733609 C>T e TERT rs2736100 A>C estão descritas nas Tabela 16, Tabela 17 e Tabela 18.

Pacientes com PV e polimorfismo TET2 rs3733609 TC + CC apresentaram maior mediana de contagem de plaquetas comparado com pacientes com genótipo TT (p=0,017) (Tabela 16). Pacientes com PV e polimorfismo TERT rs2736100 CA + AA apresentaram menor mediana de contagem de leucócitos (p=0,02) e neutrófilos (p=0,009) quando comparado com genótipo CC (Tabela 16).

Pacientes com TE e polimorfismo TET2 rs3733609 TC + CC apresentaram maior mediana de LDH (p=0,0087) e maior frequência de mutação em genes da via JAK/STAT (p=0,046) comparado com pacientes com genótipo TT (Tabela 17).

Pacientes com MFP e polimorfismo TERT rs2736100 CA + AA apresentaram menor mediana de contagem de hemoglobina (p=0,0018) e hematócrito (p=0,0050) comparado com pacientes com genótipo CC.

Nas coortes de pacientes com PV, TE e MFP não foram encontradas associações entre os polimorfismos TET2 rs3733609 e TERT rs2736100 e outras características demográficas, clínicas e laboratoriais avaliadas (Tabela 16, Tabela 17 e Tabela 18).

Tabela 16 - Características demográficas e clínicas de pacientes com PV e polimorfismo TET2 rs3736609 C > T e TERT rs2736100 A > C.

	TET2 *rs3736609*					TERT *rs2736100*				
	Total	TT n 57 (%)	TC +CC n 12 (%)	*P valor*	OR (95% CI)	Total	CC n 32 (%)	CA+AA n 40 (%)	*p valor*	OR (95% CI)
Sexo										
Feminino	38	30(53)	8(67)	0,52*	0,69(0,27-1,7)	38	19(59)	19(48)	0,35*	1,6(0,63-4,1)
Masculino	31	27(47)	4(33)			34	13(41)	21(52)		
Idade med (mín-máx)		69(37-91)	70(50-83)	0,76#			70(43-92)	68,5(37-88)	0,15#	
≥60	51	43(75)	8(67)	0,49*	1,53(0,40-5,88)	54	25(78)	29(73)	0,78*	1,35(0,45-4)
<60	18	14(25)	4(33)			18	7(22)	11(27)		
Risco cardiovascular										
Tabagismo										
Sim	15	12(21)	3(25)	0,71*	0,8(0,18-3,4)	15	8(25)	7(17)	0,56*	1,5(0,5-4,2)
Não		45	9				24	33		
HAS										
Sim	48	38(67)	10(83)	0,32*	0,4(0,07-2)	50	23(72)	27(67)	0,79*	1,2(0,44-3,3)
Não		19	2				9	13		
Diabetes										
Sim	13	10(18)	3(25)	0,68*	0,63(0,14-2,7)	13	6(19)	7(17)	1*	1,08(0,32-3,6)
Não		47	9				26	33		
Esplenomegalia										
Sim	16	15(26)	1(8)	0,27*	3,2(0,4-33)	17	9(28)	8(20)	0,41*	1,6(0,54-4,8)
Não	53	42(74)	11(92)			55	23(72)	32(80)		
Trombose										
Sim	31	28(49)	3(25)	0,2*	2,8(0,7-11,8)	33	12(37)	21(53)	0,33*	0,57(0,22-1,4)
Não	38	29(51)	9(75)			39	20(63)	19(47)		

Exames laboratoriais										
Hb (g/dl)		17,65(16,2-23,7)	18,15(16,1-21,1)	0,67#			17,9(16,2-23,7)	17,6(16,1-22,7)	0,52#	
Ht (%)		55(48-76)	57(62-49)	0,83#			56(49-76)	55(48-72)	0,32#	
Leucócitos (x10^9/L)		10,65(4-35,7)	13,25(6,8-21,3)	0,47♦			12,25(7,5-35,7)	9,95(4-29,1)	0,02♦	
Neutrófilo (x10^9/L)		7,2(2,2-24,6)	9,1(4-16,8)	0,93♦			9(5-24,6)	6,65(2,2-16,8)	0,009♦	
Plaquetas (x10^9/L)		405(70,2-1355)	689(347-1239)	0,017♦			497,5(70,2-1355)	385,5(158-1296)	0,2♦	
Blastos MO										
≥5%	2	2(3)	0	1*	0,97(0,042-22)	2	1(3)	1(2)	1*	1,3(0,07-22,9)
<5%	45	38(67)	7(58)			47	20(62)	27(67)		
LDH U/L		495(182-1602)	606(333-877)	0,43♦			556,0(266-1555)	496,5(182-1602)	0,22♦	
Cariótipo										
Favorável	34	29(51)	5(42)	1*	1,07(0,045-25)	34	15(47)	19(47)	0,58*	0,39(0,03-4,7)
Intermediário	2	2(3)	0			3	2(6)	1(3)		
Mutação JAK										
Sim	61	50(88)	11(92)	1*	0,64(0,07-5,8)	65	31(97)	34(85)	0,12*	5,4(0,62-48)
Não	8	7(12)	1(8)			7	1(3)	6(15)		
Escore de risco										
Baixo	13	11(19)	2(17)			15	6(19)	9(23)		
Intermediário	11	9(16)	2(17)	0,97□		11	6(19)	5(12)	0,74□	
Alto	45	37(65)	8(66)			46	20(62)	26(65)		
Evolução para LMA										
Sim	2	2(4)	0	1*	1,12(0,05-24)	2	1(3)	1(2)	1*	1,2(0,07-20,9)
Não	67	55(96)	12(100)			70	31(97)	39(98)		

Óbito										
Sim	7	6(11)	1(8)	1*	1,29(0,14-11,8)	7	3(9)	4(10)	1*	0,96(0,19-4,6)
Não	62	51(89)	11(92)			65	29(91)	36(90)		

O total de pacientes avaliados para a característica indicada é inferior ao total de pacientes avaliados para um dos polimorfismos avaliados.

*teste Fisher

teste t-student

☐ teste qui-quadrado

♦teste Mann- Whitney

Tabela 17 - Características demográficas e clínicas de pacientes com TE e polimorfismo em TET2 rs3736609 e TERT rs2736100.

	TET2 *rs3736609*					TERT *rs2736100*				
	Total	TT n 45 (%)	TC +CC n 7 (%)	*P valor*	OR (95% CI)	Total	CC n 17 (%)	CA+AA n 36 (%)	*p valor*	OR (95% CI)
Sexo										
Feminino	32	29(64)	3(43)	0,4*	2,4(0,47-12,18)	32	12(71)	20(56)	0,37*	1,9(0,55-6,5)
Masculino	20	16(36)	4(57)			21	5(29)	16(44)		
Idade med (mín-máx)		65(21-91	66(31-80)	0,94#			65(26-85)	65(21-92)	0,81#	
≥60	33	29(64)	4(57)	0,69*	1,35(0,26-6,84)	33	12(71)	21(58)	0,54*	1,7(0,49-5,9)
<60	19	16(36)	3(43)			30	5(29)	15(42)		
Risco cardiovascular										
Tabagismo										
Sim	13	10(22)	3(43)	0,34*	0,38(0,07-1,9)	14	4(24)	10(28)	1*	0,8(0,2-3,04)
Não		35	4				13	26		
HAS										
Sim	33	29(64)	4(57)	0,69*	1,3(0,26-6,8)	33	11(65)	22(61)	1*	1,16(0,35-3,8)
Não		16	3				6	14		
Diabetes										
Sim	10	8(18)	2(29)	0,6*	0,54(0,08-3,3)	10	5(29)	5(1)	0,26*	2,5(0,63-10,56)
Não		37	5				12	31		
Esplenomegalia										
Sim	0	3(7)	0	1*	1,2(0,05-26,4)	3	1(6)	2(6)	1*	1,06(0,089-12,6)
Não	0	42(93)	7(100)			50	16(94)	34(94)		

Trombose										
Sim	15	13(29)	2(29)	1*	1(0,17-5,9)	17	4(24)	13(36)	0,53*	0,54(0,14-2,02)
Não	37	32(71)	5(71)			36	13(76)	23(64)		
Exames laboratoriais										
Hb (g/dl)		13,9(11,3-16,6)	13,8(8,5-16,0)	0,76#			17,9(16,2-23,7)	17,6(16,1-22,7)	0,52#	
Ht (%)		55(48-76)	57(62-49)	0,83#			42(35-48,3)	40,5(26-53)	0,46#	
Leucócitos ($x10^9$/L)		9,03(3,2-20,4)	8,6(6,1-10,7)	0,61♦			9,7(6,1-15,7)	8,6(3,2-20,4)	0,35♦	
Neutrófilo ($x10^9$/L)		6,06(1,7-15,9)	5,5(2,8-7,3)	0,55♦			6,06(2,8-11,9)	5,7(1,7-15,9)	0,55♦	
Plaquetas ($x10^9$/L)		981(453-2230)	936(522-1341)	0,95♦			868,0(628-1720)	981,5(453-2466)	0,37♦	
Blastos MO										
≥5%	0	4(9)	0	1*	1,06(0,04-24,3)	0	0	4(11)	0,27*	0,18(0,009-3,6)
<5%	32	29(64)	3(43)			32	12(71)	20(55)		
LDH U/L		416(264,61-887,54)	481(376,55-4888)	0,0087♦			417(334-797,5)	429,5(264,6-4888)	0,87♦	
Cariótipo										
Favorável	24	22(49)	2(29)	1*	1,28(0,05-32,8)	27	8(47)	19(53)	1*	1,3(0,04-35,5)
Intermediário	3	3(7)	0			0	0	1(3)		
Mutação JAKV617F										
Sim	27	25(56)	2(29)	0,41*	2,87(0,5-16,4)	36	10(59)	16(44)	0,37*	1,9(0,58-6,1)
Não	25	20(44)	5(73)			27	7(41)	20(56)		
Mutação JAK/STAT										
Sim	14	9(20)	5(73)	0,046*	0,07(0,003-1,5)	13	2(12)	11(31)	0,38*	0,32(0,05-2,1)
Não	11	11(24)	0			14	5(29)	9(25)		
Escore de risco										
Baixo	23	19(42)	4(57)	0,74□		15	6(35)	9(25)	0,07□	

Intermediário	8	7(16)	1(14)			11	6(35)	5(14)		
Alto	21	19(42)	2(29)			27	5(29)	22(61)		
Evolução para LMA										
Sim	2	1(2)	1(14)	0,25*	0,13(0,007-2,4)	0	0	2(6)	1*	0,39(0,017-8,6)
Não	50	44(98)	6(86)			51	17(100)	34(94)		
Óbito										
Sim	2	1(2)	1(14)	0,25*	0,13(0,007-2,4)	0	0	2(6)	1*	0,39(0,017-8,6)
Não	50	44(98)	6(86)			51	17(100)	34(94)		

O total de pacientes avaliados para a característica indicada é inferior ao total de pacientes avaliados para um dos polimorfismos avaliados.

*teste Fisher

teste t-student

☐ teste qui-quadrado

♦teste Mann- Whitney

Tabela 18 - Características demográficas e clínicas de pacientes com MFP (n=119) e polimorfismo em TET2 rs3736609 e TERT rs2736100.

	TET2 *rs3736609*					TERT *rs2736100*				
	Total	TT n 89 (%)	TC +CC n 17 (%)	*P valor*	OR (95% CI)	Total	CC n 42 (%)	CA+AA n 77 (%)	*p valor*	OR (95% CI)
Sexo										
Feminino	43	34(38)	9(53)	0,28*	0,54(0,19-1,56)	50	18(43)	32(42)	1*	1,05(0,49-2,25)
Masculino	63	55(62)	8(47)			69	24(57)	45(58)		
Idade med (mín-máx)		76(26-97)	77(48-90)	0,75#			75,5(51-96)	77(26-97)	0,75#	
≥60	90	76(85)	14(82)	0,96*		102	34(81)	68(88)	0,28*	
<60	16	13(15)	3(18)	0,84		17	8(19)	9(12)		
Risco cardiovascular										
Tabagismo										
Sim	26	24(27)	2(12)	0,23*	2,7(0,58-13,02)	30	11(26)	19(25)	1*	1,08(0,45-2,56)
Não							31	58		
HAS										
Sim	56	46(52)	10(59)	0,6*	0,74(0,26-2,14)	61	23(55)	38(49)	0,7*	1,2(0,56-2,57)
Não							19	38		
Diabetes										
Sim	14	11(12)	3(18)	0,69*	0,65(0,16-2,6)	14	2(5)	12(16)	0,13*	0,27(0,05-1,27)
Não							40	65		
Esplenomegalia										
Sim	46	36(40)	10(59)	0,18*	0,47(0,16-1,36)	52	21(50)	31(40)	0,33*	13
Não	60	53(60)	7(41)			67	21(50)	46(60)		
Trombose										
Sim	37	31(35)	6(35)	1*	0,97(0,33-2,9)	39	13(31)	26(34)	0,83*	0,87(0,39-1,97)
Não	69	58(65)	11(65)			80	29(69)	51(66)		

Exames laboratoriais										
Hb (g/dl)		12,6(6-22,4)	11,9(7,4-16,2)	0,98#			13,55(8-22,4)	11,6(6-16,4)	0,0018#	
Ht (%)		37(25-48)	38(17-66,8)	0,81#			40,5(22-66,8)	36,25(17-49)	0,0050#	
Leucócitos (x10^9/L)		12,5(0,7-86,5)	11,6(3-78,5)	0,78♦			11,55(0,7-78,5)	12,2(1,9-86,5)	0,85♦	
Neutrófilo (x10^9/L)		8(0-73,5)	8,3(1,4-58,5)	0,62♦			8,3(9-58,5)	8,1(0,6-73,5)	0,72♦	
Plaquetas (x10^9/L)		741(1,79-2641)	627(84-2179)	0,92♦			721,5(22-1540)	758,5(14-2614	0,72♦	
Blastos MO										
≥5%	5	4(4)	1(6)	0,51*	0,58(0,05-5,7)	4	0	4(5)	0,16*	0,16(0,008-3,02)
<5%	71	62(70)	9(53)			32	12(29)	20(26)		
LDH U/L		804(240-6259)	727(429,4-2505)	0,99♦			831,1(401-4198)	740,5(240-6274)	0,11♦	
Cariótipo										
Favorável	45	39(44)	6(35)	0,62*	1,62(0,27-9,53)	47	16(38)	31(40)	0,14*	5,16(0,60-49,9)
Intermediário	10	8(9)	2(12)			11	1(3)	10(13)		
Mutação JAKV617F										
Sim	63	55(62)	8(47)	0,28*	1,8(0,64-5,1)	71	28(67)	43(56)	0,32*	1,58(0,72-3,46)
Não	43	34(38)	9(53)			48	14(33)	34(44)		
Mutação JAK/STAT										
Sim	26	21(24)	5(29)	1*	1,29(0,29-5,7)	31	12(29)	19(25)	0,09*	4,73(0,91-24,5)
Não	17	13(14)	4(24)			17	2(5)	15(19)		
Escore de risco										
Baixo	0	19(21)	4(24)			15	6	9		

Intermediário - 2										
Intermediario - 1	0	7(8)	1(6)			11	6	5		
Alto	0	19(21)	2(12)			46	20	26		
Evolução para LMA										
Sim	3	2(2)	1(6)	1*	0,91(0,08-10,4)	2	0	2(3)	1*	0,39(0,017-8,6)
Não	103	87(98)	16(94)			92	17(100)	75(97)		
Óbito										
Sim	6	6(7)	0	0,48*	1,47(0,60-3,5)	15	0	15(19)	1*	0,39(0,017-8,6)
Não	100	83(93)	17(100)			79	17(100)	62(81)		

5 DISCUSSÃO

Policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP) pertencem ao grupo da NMP BCR::ABL1-negativas clássicas, são relativamente incomuns e heterogêneos na apresentação clínica e fisiopatológica. A abordagem diagnóstica considera os achados laboratoriais, biópsia da medula óssea para a avaliação de celularidade e fibrose, pesquisa de mutações nos genes da JAK2, CALR e MPL, e citogenética para identificação de anormalidade cromossômicas. As disparidades nas estimativas de incidência e sobrevida por sexo e etnia são observadas, e fatores sociodemográficos e assistenciais influenciam no cuidado e sobrevida de pacientes com NMP BCR:ABL1-negativas clássicas (SAEIDI, 2016)(SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, 2017).

O papel das mutações em $JAK2^{V617F}$, JAK2 exon 12, CALR e MPL nas vias de sinalização JAK/STAT no desenvolvimento das NMP BCR::ABL1-negativas clássicas vem sendo estudado a muito tempo, contudo essas mutações não são sempre encontradas em pacientes com NMP, e quando presentes não são específicos a uma entidade. Estudos recentes sugeriram que mutações em genes envolvidos na senescência celular (TERT), sinalização JAK/STAT (SH2B3), diferenciação mieloide (GFI1B), danos e reparo do DNA (ATM, CHEK2) e regulação epigenética (TET2) contribuem para o desenvolvimento das NMP. O compromisso com uma melhor compreensão da biologia e dos fatores de risco é primordial para entender os critérios de diagnóstico, os sistemas de classificação, as terapias personalizadas, prognóstico, auxiliando a prevenir ou reduzir a ocorrência das NMP BCR::ABL1-negativas clássicas (TAPPER et al., 2015)(VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017)(RUMI; CAZZOLA, 2017).

Ao diagnóstico, as alterações citogenéticas são detectadas em menos de 5% nos pacientes com TE, 15% dos pacientes com PV e de 30-50% dos pacientes com MFP, sendo que as alterações mais comuns são trissomia dos cromossomo 8 e 9, del(20q), ganho de material no 1q, del(1q) e del(13q). A análise da citogenética convencional é uma ferramenta de diagnóstico importante que auxilia o manejo clinico inicial e durante o curso clinico da doença (WANG et al., 2016)(CARAMAZZA et al., 2011)(TEFFERI et al., 2018).

No presente trabalho, cariótipo normal foi observado em 106 (86%;106/124) pacientes. Anormalidade cromossômicas foram observadas em 17 (14%;17/124) pacientes. As anormalidades cromossômicas mais observadas envolveram os cromossomos 1q, 3q, 4q, 5q,

6q, 10q, 11q, monossomia dos cromossomos 7,13 e17 e trissomia dos cromossomos 8, 9, 12, 13, alterações frequentemente observadas na literatura (TEFFERI et al., 2018).

Modificações epigenéticas como metilação do DNA ou metilação e acetilação das histonas desempenham um papel fundamental na proliferação e diferenciação, e sua desregulação leva a função aberrante das células tronco e a tumorigênese. A família da proteína TET2 compartilha regiões altamente conservadas, TET1 é a abreviação para tem-eleven translocation 1, e é o nome do gene localizado no cromossomo 10q22, que está associado a translocação t(10;11)(q22;q23) presente na LMA. O gene TET2 está localizado no cromossomo 4q24, que é uma região de quebra envolvido em outras translocações em LMA: t(3;4)(q26;q24), t(4;5)(q24;p16), t(4;7)(q24;q21) e del(4)(q23q24) (NAKAJIMA; KUNIMOTO, 2014).

A proteína TET2 tem um importante papel na regulação epigenética, na diferenciação de progenitores celulares e no desenvolvimento das neoplasias hematológicas. As mutações em TET2 são encontradas em 5 -17% dos casos de NMP, essas mutações afetam a atividade enzimática da enzima TET2 dioxigenase, resultando na falha da conversão de 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina (5-hmc). Mutações nas regiões codificadoras de TET2 levam à perda de função da proteína TET2, reduzem os níveis de 5-hmc e causam aumento da diferenciação de monócitos/granulócitos em detrimento da diferenciação eritroide/linfoide, sendo assim, um importante regulador da mielopoiese (LI et al., 2015)(BOWMAN; LEVINE, 2017).

Zhang e colaboradores realizaram uma análise de associação do polimorfismo TET2 rs3733609 com a predisposição para a ocorrência de NMP BCR::ABL1-negativas clássicas com mutação $JAK2^{V617F}$. O alelo C do polimorfismo rs3733609 foi um alelo de predisposição para o desenvolvimento de NMP BCR::ABL1-negativas clássicas com mutação $JAK2^{V617F}$ (OR=2,361; p=0,01). Os pacientes com o alelo C do polimorfismo rs3733609, apresentaram aumento nos valores de leucócitos, plaquetas, hemoglobina, maior incidência de hepatoesplenomegalia e eventos trombótico (p<0,001) indicando que o alelo C contribui para a hematopoiese mieloide, principalmente na formação de colônias eritroides (p=0,005) (SHEN et al., 2016).

Na coorte estudo do presente trabalho, avaliamos a associação do polimorfismo TET2 rs3733609 com as características demográficas e clínicas dos pacientes com NMP BCR::ABL1 -negativas clássicas. A presença dos alelos C e T foram analisados em toda a coorte, no grupo NMP BCR::ABL1-negativas clássicas e mutação JAK^{V617F}, e individualmente para cada entidade; PV, TE e MFP. Entretanto, não observamos diferença estatística entre as variáveis demográficas (sexo e idade), risco cardiovascular (tabagismo, hipertensão, diabetes), eventos

hemorrágicos e trombóticos, esplenomegalia, anormalidade cromossômicas, evolução para LMA e óbito entre os grupos analisados.

Carcinogênese é um processo complexo, influenciado por fatores genéticos e ambiental, como tabagismo, má alimentação, sedentarismo, alterações reprodutivas, crescimento e envelhecimento da população (DRATWA et al., 2020).Telomerase são estruturas localizadas na região terminal do cromossomo, mantem a integridade e protege dos danos no DNA e fusão de ponta. Telômeros curtos podem causar instabilidade cromossômica, e consequentemente contribuir para o desenvolvimento do câncer. A transcriptase reversa da telomerase (TERT), unidade catalítica da telomerase, mantem a estabilidade dos telômeros. O gene TERT está localizado na região cromossômica 5p15.3 (PESTANA et al., 2017). O polimorfismo TERT rs2736100 T>G localizado no segundo intron do gene TERT foi associado com câncer gástrico (DRATWA et al., 2020).

Tang e colaboradores em 2017, realizaram um estudo retrospectivo que incluiu 72 estudos derivados de 61 artigos com um total de 108.248 pacientes e 161.472 indivíduos saudáveis com o objetivo de avaliar com maior precisão a relação do polimorfismo rs2736100 e o risco de desenvolver câncer. Os 72 estudos foram realizados em vários tipos de câncer incluindo câncer de pulmão (28 estudos), glioma (5), colorretal (4), bexiga (4), NMP (4), gástricas (3), LMA (2), mama (2), melanoma (2), tireoide (2) e outro câncer (16). Desses estudos, 37 foram realizados em asiáticos e 35 em caucasianos. Na maioria desses estudos, a frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs2736100 em TERT nos indivíduos saudáveis seguiu o equilíbrio de Hardy – Weinberg (LI et al., 2017). A análise dos resultados foi realizada com base no tipo de câncer, etnia dos pacientes e tamanho da amostra. Foi observado heterogeneidade para os cinco modelos genéticos em razão da diferença dos grupos étnicos, asiáticos e caucasianos. Assim, o efeito aleatório foi aplicado para calcular odds ratio (ORs), devido à indisponibilidade de informações relacionados a idade, sexo, tabagismo, etilismo e exposição ambiental para os pacientes e indivíduos saudáveis, e isso limitou explorar as interações gene e ambiente. O polimorfismo TERT rs2736100 foi associado ao risco geral de câncer por meio de todos os cinco modelos genéticos: modelo homozigoto (GG vs. TT) OR = 1,39, 95%, intervalo de confiança (CI) = 1,26 -1,54, p<0,001; modelo heterozigoto (TG vs TT) OR = 1,16, 95% CI = 1,11 – 1,23, p<0,001; modelo dominante (TG + GG vs TT) OR =1,23, 95% CI = 1,15 -1,31, p<0,001; modelo recessivo (GG vs TG + TT) OR =1,25, 95% CI = 1,16-1,35, p<0,001; modelo alélico (G vs T) OR =1,17, 95% CI = 1,12 -1,23, p<0,001. A metanálise indicou que o alelo G do polimorfismo TERT rs2736100 está associado com o aumento do risco geral de câncer, contudo, mais estudos envolvendo pacientes de diferentes etnias são

necessários para confirmar os resultados encontrados nesse estudo de Tang e colaboradores (LI et al., 2017).

O polimorfismo rs2736100 no gene TERT foi recentemente associado com o aumento do risco de desenvolver NMP em caucasianos, no entanto, não se sabe se essa associação está presente em outras populações étnicas, e se as frequências alélicas C e A (respectivamente G e T) refletem a incidência de NMP em uma população. Dahlström e colaboradores avaliaram o polimorfismo TERT rs2736100 C>A em 126 pacientes da Suécia e 101 pacientes da China, e controles pareados em etnia, sexo e idade. Os controles chineses apresentaram uma frequência maior do alelo A e baixa frequência do alelo C comparado com os controles da Suécia (57,4 vs 47% para alelo A, 42,6 vs 53% para o alelo C, *p*=0,006). Ambos os pacientes da Suécia e da China apresentaram uma alta frequência do alelo C comparado com os controles (62,7 vs53% e 57,4 vs 42,6% para suíços e chineses, respectivamente, *p*=0,0004) (DAHLSTRÖM et al., 2016).

Trifa e colaboradores realizaram um estudo com 529 pacientes com NMP BCR:ABL1 negativas clássicas e mutação JAK2^{V617F}, CALR e MPL positivo, sendo 184 com diagnostico de PV, 271 com TE e 74 com MFP, e 433 controles saudáveis, sexo e idade pareados com os pacientes. Os genótipos CC e CA do polimorfismo TERT rs2736100 é mais frequente na coorte de pacientes quando comparado com os controles (OR =2,4;95% CI=1,7 -3,3; *p*<0,0001)(TRIFA et al., 2016). O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto dos polimorfismos nas características demográficas, clínicas e desfechos dos pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas, de forma que controles saudáveis não foram avaliados.

Oddsson e colaboradores analisaram variantes germinativas com associação como o desenvolvimento de NMP; 237 pacientes com diagnostico de NMP, incluindo 98 com PV, 40 com TE e 26 com MFP e 34128 indivíduos saudáveis foram avaliados. Na análise multivariada, foi observado a associação do alelo C do polimorfismo TERT rs2736100 com o desenvolvimento das NMP BCR::ABL1- negativas clássicas (OR 2,32 para PV, 2,25 TE e 2,42 MFP). Foi observado a associação do alelo C do polimorfismo TERT rs2736100 com aumento da contagem de hemoglobina (*p*<0,0009), plaquetas (*p*<0,0005) e leucócitos (*p*<0,0004), esses resultados demostram o efeito do alelo C polimorfismo rs2736100 sobre a proliferação de células derivadas de um progenitor mieloide comum (Oddsson et al.,2014).

No presente estudo, o polimorfismo TET2 rs3733609 TC + CC esteve associado com maior frequência de hipertensão arterial sistêmica em pacientes com NMP clássicas com mutação JAK2^{V617F}, maior mediana de contagem de plaquetas em pacientes com PV, e maior mediana de LDH e maior frequência de mutação em genes da via JAK/STAT em pacientes com

TE, comparado com pacientes com polimorfismo TET2 rs3733609 TT. Os resultados não confirmam dados publicados na literatura (SHEN et al., 2016), mas estudos em coorte adicionais são necessários para melhor elucidação do impacto do polimorfismo TET2 rs3733609 no fenótipo e desfechos clínicos de pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas. O polimorfismo TERT rs2736100 CA + AA esteve associado com menor valor da mediana de hemoglobina, hematócrito, contagem de neutrófilos, menor frequência de mutações no gene da JAK2^{V617F} e maior frequência de diabetes mellitus tipo 2 na coorte de pacientes com NMP clássicas, menor valor da mediana de hemoglobina na coorte de pacientes com NMP clássicas com mutação JAK2^{V617F}, menor mediana de contagem de leucócitos e neutrófilos na coorte de pacientes com PV, menor mediana de contagem de hemoglobina e hematócrito em pacientes com MFP. Os resultados estão de acordo com dados da literatura que indicam que a variante da sequência germinativa TERT rs2736100_C está associada a maiores níveis de hemoglobina, contagem de leucócitos e contagem de plaquetas em pacientes com NMP (Oddsson et al.,2014).

O trabalho permitiu a caracterização da coorte de NMP BCR::ABL1 negativas clássicas em seguimento em nossa instituição, bem como evidenciou a importância dos achados laboratoriais, achados morfológicos da biópsia da medula óssea, alterações citogenéticas e moleculares (mutações nos genes da JAK2, CALR e MPL) no diagnóstico dos pacientes.

6 CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

I. A caracterização demográfica, clínica e molecular dos pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas em seguimento no HC FMRP USP está de acordo com as descrições da literatura. A realização do trabalho viabilizou a investigação de alterações citogenéticas através da citogenética convencional em pacientes com diagnóstico de NMP BCR::ABL1-negativas clássicas. O cariótipo normal foi observado em 106 (86%;106/124) pacientes, e a alteração citogenética foi observada em 17 (14%;17/124). As anormalidades cromossômicas mais frequentes envolveram os cromossomos 1q, 3q, 4q, 5q, 6q, 10q, 11q, monossomia dos cromossomos 7, 13 e 17 e trissomia dos cromossomos 8, 9, 12 e 13.

II. O estudo da frequência e o impacto clínico do polimorfismo TET2 rs3733609 em 227 pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas evidenciou que os genótipos TT, CT e CC foram observados em 84%, 14% e 1,8% dos pacientes, respectivamente. O polimorfismo TET2 rs3733609 TC + CC esteve associado com maior frequência de hipertensão arterial sistêmica em pacientes com NMP clássicas com mutação $JAK2^{V617F}$, maior mediana de contagem de plaquetas em pacientes com PV, e maior mediana de LDH e maior frequência de mutação em genes da via JAK/STAT em pacientes com TE, comparado com pacientes com polimorfismo TET2 rs3733609 TT.

III. O estudo da frequência e o impacto clínico do polimorfismo TERT rs2736100 em 242 pacientes com NMP BCR::ABL1-negativas clássicas evidenciou que os genótipos CC, CA e AA foram observados em 37%, 49% e 14% dos pacientes, respectivamente. O polimorfismo TERT rs2736100 CA + AA esteve associado com menor valor da mediana de hemoglobina, hematócrito, contagem de neutrófilos, menor frequência de mutações no gene da $JAK2^{V617F}$ e maior frequência de diabetes mellitus tipo 2 na coorte de pacientes com NMP clássicas, menor valor da mediana de hemoglobina na coorte de pacientes com NMP clássicas com mutação $JAK2^{V617F}$, menor mediana de contagem de leucócitos e neutrófilos na coorte de pacientes com PV, menor mediana de contagem de hemoglobina e hematócrito em pacientes com MFP.

REFERÊNCIAS

BOWMAN, R. L.; LEVINE, R. L. TET2 in Normal and Malignant Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, n. 8, p. 1–11, 2017.

BRUEDIGAM, C.; LANE, S. W. Telomerase in hematologic malignancies. **Current Opinion in Hematology**, v. 23, n. 4, p. 346–353, 2016.

CARAMAZZA, D. et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: A single center study of 433 patients. **Leukemia**, v. 25, n. 1, p. 82–88, 2011.

CHIBA, S. Dysregulation of TET2 in hematologic malignancies. **International Journal of Hematology**, v. 105, n. 1, p. 17–22, 2017.

DAHLSTRÖM, J. et al. TERT rs2736100 genotypes are associated with differential risk of myeloproliferative neoplasms in Swedish and Chinese male patient populations. **Annals of Hematology**, v. 95, n. 11, p. 1825–1832, 1 out. 2016.

DRATWA, M. et al. **TERT—Regulation and Roles in Cancer FormationFrontiers in Immunology**, 2020.

FENG, Y. et al. **TET2 function in hematopoietic malignancies, immune regulation, and DNA repairFrontiers in Oncology**, 2019.

HAN, J. A.; AN, J.; KO, M. Functions of TET proteins in hematopoietic transformation. **Molecules and Cells**, v. 38, n. 11, p. 925–935, 2015.

LEE, J.; GODFREY, A. L.; NANGALIA, J. Genomic heterogeneity in myeloproliferative neoplasms and applications to clinical practice. **Blood Reviews**, v. 42, p. 100708, 2020.

LI, D. et al. TET Family of Dioxygenases: Crucial Roles and Underlying Mechanisms. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 3, p. 171–180, 2015.

LI, H. et al. The TERT rs2736100 polymorphism increases cancer risk: A meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 38693–38705, 2017.

MARTÍNEZ-AVILÉS, L. et al. TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, and c-CBL genes in JAK2- and MPL-negative myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 105, n. 8, p. 17–22, 2014.

NAKAJIMA, H.; KUNIMOTO, H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. **Cancer science**, v. 105, n. 9, p. 1093–1099, 2014.

ODDSSON, A., Kristinsson, S., Helgason, H. *et al.* The germline sequence variant rs2736100_C in TERT associates with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **28**, 1371–1374, 2014.

OGURA, Y. et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis A. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2017.

PESTANA, A. et al. **TERT biology and function in cancer: Beyond immortalisationJournal of Molecular Endocrinology**, 2017.

RUMI, E.; CAZZOLA, M. **Advances in understanding the pathogenesis of familial myeloproliferative neoplasmsBritish Journal of Haematology**, 2017.

SAEIDI, K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 375–389, 2016.

SHALLIS, R. M. et al. Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. **Blood Reviews**, v. 42, n. October 2019, p. 100706, 2020.

SHEN, X. H. et al. A TET2 rs3733609 C/T genotype is associated with predisposition to the myeloproliferative neoplasms harboring JAK2V617F and confers a proliferative potential on erythroid lineages. **Oncotarget**, v. 7, n. 8, p. 9550–9560, 2016.

SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, T. J. (ED.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Revised 4t ed. Lyon: IARC, 2017. p. 39–50.

TAPPER, W. et al. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–11, 2015.

TEFFERI, A. et al. Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: Analysis based on 1002 informative patients. **Leukemia**, v. 32, n. 5, p. 1189–1199, 2018.

TORRES, D. G. et al. JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, 2022.

TRIFA, A. P. et al. TERT rs2736100 A>C SNP and JAK2 46/1 haplotype significantly contribute to the occurrence of JAK2 V617F and CALR mutated myeloproliferative neoplasms – a multicentric study on 529 patients. **British Journal of Haematology**, v. 174, n. 2, p. 218–226, 2016.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 667–679, 2017.

WANG, W. et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. **Blood**, v. 127, n. 22, p. 2742–2750, 2016.

ANEXO 1

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise de polimorfismo em TET2 em neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas.

Pesquisador: Fabíola Traina

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 33443420.0.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.407.275

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVASAs neoplasias mieloproliferativas clássicas Filadélfia negativas (NMPs) são caracterizadas por expansão clonal em nível progenitor hematopoético com superprodução de progênie mieloide e eritroide madura. Clinicamente, eles compartilham as características de hipercelularidade da medula óssea, aumento da incidência de trombose ou hemorragia e aumento da taxa de transformação em leucemia mieloide aguda, que geralmente é fatal. Os critérios de diagnóstico atuais separam as NMPs Filadélfia negativas em três entidades distintas da doença: policitemia vera (PV) - caracterizada principalmente por um aumento de massa de glóbulos vermelhos; trombocitemia essencial (TE) - caracterizada por um aumento isolado no número de plaquetas; e mielofibrose primária (MFP) - na qual o compartimento hematopoético é gradualmente substituído por fibras de colágeno, levando à falência da medula óssea e hematopoese extramedular, o que geralmente está associado a sintomas constitucionais (3).POLICITEMIA VERAA policitemia vera (PV) é uma neoplasia mieloproliferativa crônica (NMP) caracterizada pelo aumento da produção de glóbulos vermelhos independente dos mecanismos que normalmente regulam a eritropoese. Praticamente todos os pacientes carregam a mutação somática de ganho de função JAK2V617F ou outra mutação funcionalmente semelhante à JAK2 que resulta em proliferação não apenas da linhagem eritroide, mas também de granulócitos e

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

megacariócitos. Geralmente, são reconhecidas duas fases da PV: uma fase policitêmica, associada à nível elevado de hemoglobina, hematócrito e aumento da massa de hemácias, e uma fase de mielofibrose pós policitêmica (mielofibrose pós-PV), na qual citopenias, incluindo anemia, estão associados a hematopoese ineficaz, fibrose da medula óssea, hematopoese extramedular e hiperesplenismo. A progressão natural da PV também inclui uma baixa incidência de evolução para uma fase mielodisplásica/pré-leucêmica e/ou fase de explosão (isto é, leucemia aguda). Todas as causas de eritrocitose secundária, policitemia hereditária e outras NMPs devem ser excluídas (1). O diagnóstico requer associação das características clínicas, laboratoriais e histológicas da medula óssea. TROMBOCITEMIA ESSENCIALA trombocitemia essencial (TE) é uma NMP que envolve principalmente a linhagem megacariocítica. É caracterizada por trombocitose sustentada (contagem de plaquetas 450 x 109/L) no sangue periférico, aumento do número de megacariócitos maduros grandes na medula óssea e clinicamente pela ocorrência de trombose e/ou hemorragia. Como não existe um marcador genético ou biológico conhecido para TE, outras causas de trombocitose devem ser excluídas, incluindo outras NMPs, distúrbios inflamatórios e infecciosos, hemorragias e outros tipos de neoplasias hematopoéticas e não-hematopoéticas. A presença da fusão do gene BCR-ABL1 exclui o diagnóstico de TE (1). MIELOFIBROSE PRIMÁRIAA mielofibrose primária (MFP) é uma neoplasia mieloproliferativa clonal (NMP) caracterizada por uma proliferação predominantemente de megacariócitos e granulócitos anormais na medula óssea, que na doença totalmente desenvolvida estão associados à deposição reativa do tecido conjuntivo fibroso e à hematopoese extramedular. Há uma evolução gradual de um estágio inicial préfibrótico/inicial, caracterizado por medula óssea hipercelular com fibrose reticulina ausente ou mínima, para um estágio fibrótico evidente com reticulina ou fibrose colágena acentuada na medula óssea e, frequentemente, osteosclerose. O estágio fibrótico do MFP é clinicamente caracterizado por leucoeritroblastose no sangue, hepatomegalia e esplenomegalia (1). MUTAÇÕES JAK2V617F EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVASJAK2 é uma tirosina-quinase citoplasmática, necessária para a transdução de sinal dos receptores de citocina tipo I, que inclui os de fator de estimulação de trombopoetina, eritropoetina e colônia de granulócitos (G-CSF) e, portanto, desempenha um papel vital na mielopoese (3). Uma mutação pontual adquirida somaticamente G>T que substitui valina por fenilalanina na posição 617 (V617F) no éxon 14 do JAK2 (JAK2V617F), ou inserções e deleções raras no éxon 12 que foram descobertas posteriormente (6), são encontradas na vasta maioria dos pacientes com PV. Além disso, o JAK2V617F também é encontrado em mais da metade dos pacientes com TE e MFP. Como resultado, o teste de mutação JAK2 tornou-se firmemente incorporado como uma investigação de primeira linha em protocolos

de diagnóstico clínico para pacientes com suspeita de NMP (1,5,6).A mutação JAK2V617F ocorre no domínio JH2 (ou "pseudoquinase") e resulta na ativação constitutiva do domínio quinase JH1. O mecanismo pelo qual isso ocorre está se tornando cada vez mais claro (4). Em resumo, há evidências de que a mutação pode reduzir a função autoinibitória do domínio JH2 através de alterações na conformação JH1- JH2 (7) e na ligação de adenosina trifosfato (ATP) (8). Mutações no

éxon 12, localizadas entre F533 e F547, na região de ligação entre os domínios SH2 e JH2, são encontradas em 1-2% dos pacientes com PV (10). Essas mutações também induzem ativação constitutiva, mas em maior grau que JAK2V617F, com maior fosforilação de JAK2 e ativação da via MAPK, além de resultar em crescimento independente de citocinas (9). O mecanismo pelo qual essas mutações agem é menos conhecido, mas, dada a sua localização, é provável que elas também perturbem as interações no domínio JH1-JH2. Além disso, diversos papéis não canônicos também foram descritos para o JAK2, que podem ser alterados por mutações patogênicas. Verificou-se que JAK2 se localiza no núcleo, onde pode fosforilar a tirosina 41 na histona H3 (11). Isso tem sido associado ao aumento da expressão de LMO2, que está implicado na leucemogênese. A expressão de JAK2V617F também foi associada, in vitro, a um aumento da recombinação homóloga, a ativação de mecanismos de reparo de DNA, aneuploidia e aquisição de um fenótipo de mutador (13). Além disso, existem evidências de que JAK2V617F pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e reduzir a resposta apoptótica a danos no DNA, inibindo a via de desaminação Bcl-xl (12,14).As NMPs persistem por longos

períodos em pacientes, indicando que a mutação JAK2V617F ocorre em células com capacidade de autorrenovação a longo prazo. De fato, o JAK2V617F é detectável em células-tronco hematopoéticas (CTH) isoladas por citometria de fluxo através do uso de marcadores de superfície celular característicos de tais populações (CD34+ CD38- CD90+ Lin), bem como em mieloides de linhagem múltipla células e, em alguns estudos, células linfoides (15,16). Além disso, com modelos de camundongos knockin que expressam condicionalmente JAK2V617F, as células de propagação da doença NMP se mostraram CTHs com capacidade de autorrenovação a longo prazo (17).No entanto, também existem inúmeras linhas de evidência que sugerem que o JAK2V617F não confere uma forte vantagem clonal às CTHs. Nos pacientes, a carga do alelo

JAK2V617F permanece estável por décadas, geralmente em níveis muito baixos, em vez de aumentar gradualmente (18, 19). Ao avaliar as células CD34+ CD38- CTH de pacientes com NMP (PV e ET) com JAK2V617F, uma expansão clonal significativa não foi demonstrada (20). Além disso, as células CD34+ CTH de pacientes com PV que hospedam a mutação JAK2V617F exibem um enxerto pobre em camundongos NOD/SCID/IL2Rgama-nulo (imunodeficientes) em comparação

com células do tipo selvagem (21, 22). Recentemente, a mutação JAK2V617F também foi demonstrada no sangue de indivíduos normais sem nenhuma anormalidade hematológica evidente (23-25).A capacidade de outras mutações de aumentar a vantagem clonal de CTHs ou progenitores mutados em JAK2V617F foi demonstrada em estudos que investigam o papel da
concorrência de mutação em TET2 (ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2) e JAK2, realizadas com células-tronco do paciente (26, 27) ou modelos de camundongos transgênicos (28, 29). Vale ressaltar, no entanto, que em um número significativo de pacientes com mutação no JAK2V617F, mutações somáticas adicionais não foram demonstradas (30). Isso sugere que outros fatores podem modular a função das células tronco e influenciar o desenvolvimento de NMP no contexto de JAK2V617F.MUTAÇÕES MPL EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVASAté 50-
60% dos casos de TE e MFP não apresentam mutações no JAK2. Mutações somáticas adquiridas no gene MPL (oncogene do vírus da leucemia
mieloproliferativa; 1p34) estão presentes em aproximadamente 4% dos pacientes com TE e até 10% dos pacientes com MFP (31, 32). O MPL
codifica o receptor de Tpo, a principal citocina estimuladora de megacariopoese, explicando a falta dessas mutações na PV (33). Na grande maioria
dos pacientes, as mutações no JAK2 e no MPL são mutuamente exclusivas, sugerindo que as mutações no MPL têm efeitos semelhantes nos
eventos de sinalização a jusante (34). MUTAÇÕES CALR EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVASEm 2013, através da metodologia de
sequenciamento de nova geração, a identificação de mutações em calreticulina (CALR) em 70-80 % dos pacientes com NMP preencheram a lacuna
do entendimento da patogênese molecular dos pacientes com NMP negativos para JAK2 e MPL9,10. As mutações em CALR mais frequentes
(~80%), consistem em inserções e / ou deleções no éxon 9, e são classificadas em tipo-1 (L367fs*46, deleção de 52pb) e tipo-2 (K385fs*47, inserção
de 5pb). Todas as outras mutações podem ser categorizadas como semelhantes aos tipos 1 ou 2, dependendo se deleção (tipo 1) ou inserção (tipo
2) de aminoácidos na porção C-terminal9–12. How J., Hobbs G.S. e Mullally A. revisaram o estado da arte sobre mutações em CALR em NMP, e os
principais tópicos serão aqui destacados13. As mutações em CALR compartilham o mesmo efeito, a perda do KDEL e a geração de um novo

domínio C-terminal com carga elétrica positiva, que tem como resultado um ganho de função à proteína e promove a interação física entre a CALR e
o MPL no RE15,16. A proteína CALR mutante trafega através do RE e se liga ao MPL imaturo. O complexo CALR mutante-MPL é transportado,
através do complexo de Golgi, para a superfície celular. O resultado da interação patogênica de CALR mutante-MPL é a ativação de sinalização
MPL-JAK/STAT5 independente de ligante que resulta na expansão clonal da célula-tronco hematopoiética de longo prazo e megacariócitos. Em TE,
a presença de mutação CALR está associada a maior sobrevida livre de trombose em comparação a pacientes com mutação JAK2 ou MPL, mas
não em relação a pacientes triplo negativos20–22. Em TE, o genótipo não está associado a sobrevida. Entretanto, em MFP, a presença de mutação
CALR prediz melhor sobrevida global, enquanto que pacientes triplo negativos apresentam a pior sobrevida, de forma que a ausência de mutação
CALR foi incorporada a sistemas de estratificação de risco para MFP23–25.VARIAÇÕES GENÉTICAS E MUTAÇÕES TET2 EM NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVASVárias interações genéticas adicionais moldam as consequências moleculares, celulares e clínicas das mutações nas
NMPs. A variação constitucional que predispõe às NMPs pode ser classificada em 2 grupos: (1) variantes comuns, prevalentes na população, que
resultam em uma pequena predisposição à NMP; e (2) variantes raras, frequentemente encontradas em NMPs familiares, que possuem uma
penetração mais alta para a doença. Exemplos bem conhecidos do primeiro incluem o haplótipo JAK2 46/1, bem como polimorfismos de nucleotídeo
único no gene TERT, que conferem uma chance de 1,5 a 3,5 vezes maior de NMP (47).Vários locais de predisposição adicionais para NMPs foram
recentemente identificados entre genes envolvidos na senescência celular (TERT), sinalização JAK-STAT (SH2B3), diferenciação mieloide (GFI1B),
danos e reparo do DNA (ATM, CHEK2) e regulação epigenética (TET2); isso sugere que o fundo genético da linha germinativa de um indivíduo pode
influenciar diversas funções celulares biológicas para acentuar as consequências moleculares e celulares dos clones nascentes de NMP após a
aquisição de mutações fenotípicas do driver (42).O TET2 converte 5-metilcitosina (5mC) em 5-

hidroximetilcitosina (5-hmC), um processo que é
considerado particularmente importante para a regulação de genes em células-tronco e desenvolvimento embrionário. Observa-se uma redução no 5
-hmC em pacientes com TET2 mutado e aumento da capacidade de autorrenovação e diferenciação mieloide (43,44). Sabe-se que o cluster HOXA,
implicado no comprometimento da linhagem mieloide, é regulado pelo TET2, sugerindo um possível mecanismo pelo qual mutações TET2 resultem
neoplasia mielode (45).Mutações em TET2 com perda de função são encontradas em 5 a 17% dos pacientes com NMP (26). Os modelos murinos
com função TET2 atenuada exibem a expansão do compartimento de CTH. A perda de TET2 resulta em proliferação mielomonocítica e
características fenotípicas semelhantes à leucemia mielomonocítica crônica (CMML) (39). De fato, os distúrbios mielodisplásicos/mieloproliferativos
(SMD/NMP) geralmente exibem perda bialélica de TET2, através da aquisição de mutações no composto TET2 ou perda de heterozigose no
cromossomo 4q24 (26). Demonstrou-se que os tumores com TET2 mutado exibem níveis reduzidos de 5-hmC (40). Clinicamente, um estudo
mostrou que as mutações no TET2 estão associadas a um risco aumentado de transformação leucêmica e menor sobrevida, mas outros estudos
não encontraram essas associações clínicas (41).Curiosamente, foram encontradas mutações em TET2 em mulheres idosas normais que
apresentam hematopoese clonal na ausência de qualquer anormalidade nos parâmetros do hemograma (24). Esta descoberta, em conjunto com
dados de modelos murinos, sugere que as mutações TET2 conferem uma vantagem clonal ao nível de CTH, em vez de impulsionar a
superprodução de células eritróides e/ou megacariocíticas, característica das NMPs.Dados de modelos murinos com JAK2V617F, bem como a
perda de TET2, mostram que a mutação em TET2 pode conferir uma vantagem clonal de células-tronco em células mutadas por JAK2 e ajudar a
propagar e acelerar fenótipos de doenças (28). Os efeitos das mutações TET2 na autorrenovação das CTH podem alterar os fenótipos de NMP além
de simplesmente proporcionar uma vantagem de células-tronco aos clones de NMP. Em um estudo de NMPs mutados para TET2 e JAK2, verificouse que a ordem na qual essas mutações foram

adquiridas estava associada à idade do paciente na apresentação, presença de homozigose JAK2V617F, incidência de complicações trombóticas e fenótipo da doença na apresentação. Portanto, parece que a capacidade de expansão de um subclone homozigoto JAK2V617F também pode estar relacionada à natureza dos clones concorrentes na medula óssea, bem como a outras mutações já presentes na célula quando a homozigose JAK2V617F é adquirida. As mutações no TET2 não parecem estar associadas à subtipos particulares de NMP, mas foram encontradas, em um estudo, correlacionadas com níveis mais pobres de sobrevida global e progressão aumentada para LMA (41).SNP rs3733609 TET2Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem influenciar o curso da doença e o resultado das neoplasias hematológicas. O haplótipo GGCC ou 46/1 no lócus JAK2 predispõe a NMP esporádica e familiar positivo para JAK2 (48-50). Recentemente, foi relatado que a variante da sequência germinativa rs2736100 C no TERT contribui para o NMP esporádica e familiar (51, 52). Essas variações germinativas nos loci JAK2 e TERT podem explicar parte do risco da população de desenvolver NMP. A presença de fatores genéticos modificadores do hospedeiro ou mutações concomitantes em outros genes, como TET2, ASXL1, podem modular o fenótipo NMP e contribuir para a patogênese do NMP (53-55).O genótipo TET2 rs3733609 C/T esteve associado a maior risco de NMP (odds ratio (OR) = 2,361; P = 0,01). Pacientes com NMP e genótipo rs3733609 C/T apresentaram aumentou da concentração de hemoglobina, da contagem de leucócitos e plaquetas, hiperplasia de medula óssea, esplenomegalia e hepatomegalia em comparação com o genótipo T/T. Eventos trombóticos foram mais comuns em pacientes com NMP com rs3733609 C/T do que naqueles com genótipo T/T. Foi observado que a frequência do genótipo rs3733609 C/T (localizado no éxon 9 do TET2) é maior em pacientes com NMP do que no grupo controle, sugerindo que o TET2 rs3733609 C/T está associado a uma predisposição a NMPs esporádica. A presença do SNP TET2 rs3733609 C/T também foi relacionada a piores parâmetros hematológicos e à maior incidência de eventos trombóticos e hepatoesplenomegalia (46).A detecção de polimorfismos que se correlacionam com o fenótipo de NMP e suas complicações

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

auxilia no entendimento da fisiopatologia da doença. Nosso estudo pretende avaliar a correlação entre a presença do SNP TET2 rs3733609 e parâmetros clínicos em pacientes com diagnóstico de NMP.

Hipótese:
Será testada a hipótese que o genótipo TET2 rs3733609 C/T está associado a maior risco de NMP e que o genótipo TET2 rs3733609 C/T está associado com fenótipo de NMP com maior concentração de hemoglobina, da contagem de leucócitos e plaquetas, e maior incidência de eventos trombóticos, em comparação com o genótipo T/T.

METODOLOGIA PROPOSTA
Casuística
Serão incluídos no estudo, um grupo de controles e um grupo de pacientes com NMP.
O grupo de controles incluirá indivíduos que doaram sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto; serão utilizadas amostras de sangue periférico
remanescentes dos testes de sorologia realizados na rotina do atendimento do doador de sangue, apenas informações sobre sexo e idade serão
obtidas dos registros dos doadores de sangue. Prevemos a inclusão de 200 controles.
O grupo de pacientes com NMP incluirá pacientes adultos (acima de 18 anos) com diagnóstico de NMP classificadas como PV, TE e MFP atendidos
no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Prevemos a inclusão de 200
pacientes com NMP. O diagnóstico dos pacientes será confirmado com base em dados clínicos, de hemograma, mielograma, biópsia de medula
óssea e biologia molecular. O diagnóstico definitivo seguirá os critérios recomendados pela Organização Mundial da Saúde 2017. Dados
demográficos e clínicos serão obtidas do prontuário médico: idade, sexo, parâmetros do hemograma, visceromegalias (exame físico), mielograma,
biópsia de medula óssea, mutação JAK2 e calreticulina, tratamentos recebidos, presença de eventos tromboembólicos, evolução para leucemia
mieloide aguda, data do diagnóstico, data da última avaliação e óbito. Para os indivíduos com NMP, serão utilizados material remanescente coletado
para fins de exame diagnóstico de pesquisa de mutação JAK2V617F; não haverá necessidade de

picada e coleta específica para o estudo.
Obtenção do DNA. Após a obtenção de material de sangue periférico remanescente dos testes de triagem de doadores de sangue, dar-se-á início
ao processamento das amostras. O DNA genômico será extraído a partir do sangue total, através do Kit Gentra Puregene Blood (Qiagen), de acordo
com orientações do fabricante. Resumidamente, será utilizada solução de lise de hemácias, solução de lise de glóbulos brancos e solução de
precipitação de proteína para retirada dos restos celulares. Posteriormente será usado isopropanol para precipitação do DNA e solução de
hidratação de DNA para reconstituição do pellet. Após a extração, a integridade e a concentração do DNA serão verificadas através da leitura em
aparelho Nano Vue GE. Todas as amostras de DNA extraídas serão armazenadas em freezer -20ºC.
Para as amostras de pacientes com NMP, serão utilizadas amostras remanescentes de DNA extraído de sangue periférico, coletadas na ocasião do
diagnóstico e processadas para coleta de DNA e pesquisa da mutação JAK2V617F, essencial para o diagnóstico de NMP.
Análise do SNP TET2 rs3733609 e TERT rs2736100
A presença do SNP TET2 rs3733609 e TERT rs2736100 será avaliada através da técnica de qPCR (do inglês, Real-Time Quantitative PCR),
utilizando o equipamento 7500 (Applied biosystems, EUA) e a metodologia TaqMan® (Assay ID C__25994807_10 [discriminação alélica CC, TT ou
CT] e Assay ID C__1844009_10 [discriminação alélica AA, CC ou AC]). Nesse método, a discriminação alélica é realizada através de sondas de
hidrólise, oriunda da liberação e ativação de um fluorocromo ligado a uma sonda de hidrólise específica para cada alelo do polimorfismo de
interesse. Serão utilizados 5 µL do MasterMix, 0,5 µL da sonda específica, 2 µL de DNA (50 ng/ µL), 2,5 µL de água autoclavada. A reação será
submetida a 95ºC 10 minutos, 50ºC 3 minutos, seguido de 40 ciclos 95ºC 10 segundos, 60ºC 1 min em equipamento de PCR em tempo real. O
equipamento de PCR em tempo real que será utilizado é o 7500 versão 2.0.6.
Critério de Inclusão:
Grupo de pacientes com NMP-Diagnóstico de NMP;-Ser maior que 18 anos.
Grupo de controles-Doador de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto;-Ser maior que 18 anos.

Critério de Exclusão:
Grupo de pacientes com NMP-Recusa em assinar TCLE (exceto, se paciente vir a óbito);-Ausência ou baixa qualidade do material colhido ao
diagnóstico.
Grupo de controles-Ausência de material de sangue periférico remanescente dos exames de triagem da doação de sangue.

Objetivo da Pesquisa:
Objetivo Primário:
I
Objetivo Secundário:
Avaliar a associação do polimorfismo TET2 rs3733609 com o desenvolvimento de NMP.
Avaliar a associação do polimorfismo TET2 rs3733609 com características clínicas em pacientes com NMP, quanto à:• Classificação OMS 2017: PV, TE, MFP.• Parâmetros hematimétricos.• Presença de trombose, hepatomegalia, esplenomegalia.• Sobrevida global e evolução para leucemia mieloide aguda.• Presença da mutação JAK2V617F ou CALR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
RISCOS
Os riscos ou desconfortos da pesquisa estão relacionados com o risco da quebra do sigilo de alguma informação. Informações sobre dados pessoais, condições de saúde e tratamentos, serão obtidas do prontuário do paciente. Todos os dados serão usados somente para a realização da pesquisa. Mas, mesmo os pesquisadores se comprometendo a fazer todos os esforços para que as normas éticas sejam seguidas, existe o risco da quebra do sigilo de alguma informação. Afim de minimizar os riscos de quebra de sigilo, apenas a equipe de pesquisa terá acesso ao prontuário médico.

BENEFÍCIOS
Os participantes não terão nenhum benefício imediato por participar do estudo. As informações obtidas por este trabalho poderão auxiliar no melhor entendimento da fisiopatologia das NMP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Trata-se de emenda 3 ao projeto de pesquisa conforme carta datada de 09 de dezembro de 2021.

JUSTIFICATIVA DA EMENDA

Solicitamos a inclusão dos alunos de mestrado Brunno Gilberto Santos de Macedo e Manuela Albuquerque de Melo na equipe do projeto de pesquisa "Análise de polimorfismo em TET2 em neoplasias mieloproliferativas BCR- ABL 1 negativas", exercendo a função de análise de prontuários, atualização de dados referentes aos pacientes incluídos no projeto e coleta de amostras. O projeto e o TCLE contendo a inclusão dos pesquisadores na equipe foi anexado na Plataforma Brasil na forma de novo documento contendo no rodapé de cada página a identificação da nova versão (Projeto versão 4, TCLE versão 5), com a respectiva data de modificação do referido documento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos da emenda 3 foram devidamente apresentados ao CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, a EMENDA 3, assim como o Projeto de pesquisa versão 4 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 5, devem ser enquadrados na categoria APROVADO. O CEP tomou ciência do Relatório referente ao período de 17 de setembro de 2020 – 31 de março de 2022.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda ao Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1874363_E3.pdf	03/05/2022 13:08:38		Aceito
Outros	Relatorio_TET_TERT_11042022_Ass.pdf	03/05/2022 13:07:58	Fabíola Traina	Aceito
Outros	Emenda3_09122021.pdf	09/12/2021 14:08:38	NATASHA PEIXOTO FONSECA	Aceito

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_TET2_NMP_v4_09122021.pdf	09/12/2021 14:01:21	NATASHA PEIXOTO FONSECA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_TET2_NMP_v5.pdf	09/12/2021 14:00:44	NATASHA PEIXOTO FONSECA	Aceito
Outros	Emenda_2_1304201.pdf	13/04/2021 12:27:31	RAISSA SILVA TRISTAO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_TET2_NMP_v4.pdf	13/04/2021 12:25:16	RAISSA SILVA TRISTAO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_TET2_NMP_v3_13042021.pdf	13/04/2021 12:24:06	RAISSA SILVA TRISTAO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_TET2_NMP_v2_27102020.pdf	27/10/2020 17:16:10	Fabíola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_TET2_NMP_v3.pdf	27/10/2020 17:11:41	Fabíola Traina	Aceito
Outros	Emenda1_27102020_FT.pdf	27/10/2020 17:09:56	Fabíola Traina	Aceito
Outros	RESPOSTA_CEP_01092020.pdf	01/09/2020 17:47:24	Fabíola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE_TET2_Controle_v2_30072020.pdf	01/09/2020 17:47:07	Fabíola Traina	Aceito
Outros	Parecer_Hemocentro01092020.pdf	01/09/2020 17:46:33	Fabíola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_TET2_NMP_v2.pdf	01/09/2020 17:45:55	Fabíola Traina	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CARTA_PARA_CRIACAO_BIORREPOSITORIO_TET2_NMP_FT_Ass.pdf	10/06/2020 12:49:47	Fabíola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_TET2_NMP_v1.pdf	09/06/2020 15:16:33	Fabíola Traina	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE_TET2_ControleAss.pdf	09/06/2020 15:14:49	Fabíola Traina	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TET2_NMP_v1.pdf	09/06/2020 15:14:38	Fabíola Traina	Aceito
Orçamento	AprovacaoOrcamentoTET2_NMP.pdf	09/06/2020 15:14:23	Fabíola Traina	Aceito
Orçamento	OrcamentoDetalhado_TET2_NMP.pdf	09/06/2020 15:14:06	Fabíola Traina	Aceito
Cronograma	Cronograma_TET2_NMP.pdf	09/06/2020 15:13:47	Fabíola Traina	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto_TET2NMP_UPC_Coordenacao_0000002674.pdf	09/06/2020 15:13:29	Fabíola Traina	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 13 de Maio de 2022

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br