Renato Sampaio Tavares

Caracterização clínica, citogenética e molecular de pacientes brasileiros com mielofibrose primária e mielofibrose pós-policitemia vera e pós-trombocitemia essencial

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciência Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Prof. Dr. Israel Bendit

Comentado [IF1]: O texto foi modificado de acordo com o Guia de Normalização da Biblioteca FMUSP, mantenha desta forma.

Mantenha estas informações justificadas e recuadas em pelo menos 7,5cm (meio da página)

O nome do seu programa foi alterado de acordo com a ficha do aluno.

São Paulo
2021

Renato Sampaio Tavares

Caracterização clínica, citogenética e molecular de pacientes brasileiros com mielofibrose primária e mielofibrose pós-policitemia vera e pós-trombocitemia essencial

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciência Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Prof. Dr. Israel Bendit

Comentado [IF2]: O texto foi modificado de acordo com o Guia de Normalização da Biblioteca FMUSP, mantenha desta forma.

Mantenha estas informações justificadas e recuadas em pelo menos 7,5cm (meio da página)

O nome do seu programa foi alterado de acordo com a ficha do aluno.

São Paulo
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tavares, Renato Sampaio
Caracterização clínica, citogenética e molecular de pacientes brasileiros com mielofibrose primária e mielofibrose pós-policitemia vera e pós-trombocitemia essencial / Renato Sampaio Tavares. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientador: Israel Bendit.

Descritores: 1.Mielofibrose 2.Fatores de risco 3.Cariótipo 4.Mutação 5.Sobrevida 6.Neoplasias

USP/FM/DBD-173/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Para os nossos pacientes
do SUS, que seu desamparo
seja cada vez menor

Agradecimentos

Ao Prof. Dr Israel Bendit, orientador desta tese, incentivador e inspirador, exemplo de pesquisador, médico e de ser humano, a quem tenho orgulho de poder chamar de amigo.

Ao Douglas Almeida Silveira, pelas análises estatísticas e dos painéis de NGS, e pela enorme contribuição voluntária para este projeto.

À Dra Monika Conchon, co-idealizadora deste projeto, pelo apoio, pelas análises citogenéticas, pessoa sem a qual este estudo não teria existido.

Aos pesquisadores Dra Nelma Clementino, Dra Katia Pagnano, Dra Ana Clara Knesse do Nascimento, Dra Samila Santana, Dra Vaneuza Funke, Dr Renato Centrone, Dra Fernanda Seguro e Dr Jaisson Bortolini, pela participação imprescindível neste projeto.

À Patrícia Sanches Salles, pela criação do banco de dados na plataforma REDCap, a Antônio Lancha Ruiz, por realizar a análise das amostras para as mutações *JAK2* e *CALR*, e Dr Sabri Sabee Sanabani por realizar a análise das amostras por NGS.

À equipe de pesquisa do centro de pesquisas do HC-UFG, em especial às coordenadoras Tayse Silva dos Santos, Tcherlli Mara Rodrigues de Oliveira Juliana Araújo Diniz, e à enfermeira Larissa Lara Pereira de Souza, pelo grande auxílio na coleta de amostras, levantamento de dados e confecção da tese.

À equipe de hematologia do HC-UFG, Dras Melaine Stefane Barbosa, Dra Yana de Sousa Rabelo, Dra Luciana Cristina Nahas, Dra Fernanda Meireles Kluthcouski, Dra Danielle Isadora Blumenschein, pelo apoio no atendimento dos nossos pacientes e suporte na minha ausência.

Às residentes Rafaela Farias Fonseca, Natalia Mirelle Carrijo dos Santos Guilharde e Raister Roseake Maia dos Santos no preenchimento das CRFs e do REDCap.

A equipe médica do Hemalobor, em especial Dra Reginara Dias Fernandes e Dr Ubirajara Fernandes, que sempre me apoiaram em meus projetos pessoais e profissionais.

“Quem não sabe o que busca, não identifica o que acha”

Immanuel Kant

Esta tese de doutorado está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO ……..…… 1
1.1 Escores prognósticos clássicos na mielofibrose ……..…… 4
1.2 O impacto prognóstico das alterações moleculares e de outras alterações de cariótipo ……..…… 6
1.3 As particularidades do cariótipo na mielofibrose ……..... 12
2 OBJETIVOS ……..……... 14
2.1 Objetivos primários …….. 14
2.2 Objetivos secundários ……..15
3. MATERIAL E MÉTODOS ……..…….. 16
3.1 Desenho do estudo …….. 16
3.2 População de pacientes ……...……... 17
3.3 Critérios de inclusão e exclusão …… 17
3.4 Revisão do diagnóstico ……...…… 17
3.5 Análises citogenética e moleculares das amostras de sangue ……. 18
3.6 Análise estatística …… 22
3.7 Procedimentos éticos ……... 23
3.8 Gerenciamento de dados …… 23
3.9 Emendas ao protocol e outras alterações …… 24
3.10 Outros procedimentos do estudo …… 24
3.11 Política de divulgação …… 26
3.12 Propriedade de dados e autoria de publicação …… 26
4. RESULTADOS …… 28
4.1 População estudada …… 28
4.2 Dados clínicos ……28
4.3 Resultados mutacionais …….. 31
4.4 Resultados de cariótipo de medulla óssea e de sangue periférico .. 34
4.5 Aplicação dos escores prognósticos …… 37
4.6 Comparação entre os escores prognósticos …… 43
4.7 Análise de sobrevida …… 48
5. DISCUSSÃO …… 62

5.1 Dados demográficos 62
5.2 Dados da análise mutacional 64
5.3 Dados citogenéticos 66
5.4 Aplicação dos escores prognósticos e sua comparação 69
5.5 Análise de sobrevida 84
6. CONCLUSÕES 90
7. ANEXOS 96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRF	Ficha Clínica
BPC	Boas Práticas Clínicas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DIPSS	Escore Prognóstico Internacional Dinâmico
DIPSS *plus*	Sistema Internacional de Escore Prognóstico Dinâmico Revisado
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
HMR	Alterações moleculares de Alto Risco
IPSS	Escore Prognóstico Internacional
	IWG-MRT *International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment*
MF	Mielofibrose
MFP	Mielofibrose Primária
MF – PV	Mielofibrose Secundária a Policitemia Vera
MF-TE	Mielofibrose Secundária a Trombocitemia Essencial
MIPSS70	Sistema Internacional de Escore Prognóstico Aprimorado por Análise Mutacional
MIPPS70 plus	Escore de Prognóstico Internacional Análise Mutacional Revisado
MIPPS70 *plus* 2.0	Escore de Prognóstico Internacional Mutacional Revisado versão 2.0
MYSEC-PM	Modelo Prognóstico para Mielofibrose Secundaria a Policitemia Vera e Trombocitemia Essencial
NPM	Neoplasia Mieloproliferativa Crônica
NGS	Sequenciamento de Nova geração
OMS	Organização Mundial de Saúde
Ph	Philadelfia
SMD	Síndrome Mielodisplásica

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMO-A	Transplante Alogênico de Medula Óssea
TN	Triplo-negativo

LISTA DE FIGURAS, ILUSTRAÇÕES, EQUAÇÕES E TABELAS

Gráficos:

Gráfico 1 – Grau de fibrose medula óssea em 221 pacientes com MF 29
Gráfico 2 – IPSS em 229 pacientes 38
Gráfico 3 - DIPSS em 229 pacientes 38
Gráfico 4 – DIPSS *plus* em 190 pacientes 39
Gráfico 5 – MIPSS70 em 171 pacientes 40
Gráfico 6 – MIPSS70 *plus* em 152 pacientes 40
Gráfico 7 – MIPSS70 *plus* 2.0 em 152 pacientes 41
Gráfico 8 – GIPSS em 152 pacientes 42
Gráfico 9 – MYSEC-PM em 20 casos de MF-VP e MF-TE 42
Gráfico 10 – Comparação entre os escores IPSS, DIPSS, DIPSS *plus*, MIPSS70 *plus* e MIPSS70 *plus* 2.0 em 230 pacientes com MF 80

Tabelas:

Tabela 1 - Dados demográficos dos 230 pacientes com MF 30
Tabela 2 – Frequência mutacional em 230 pacientes com MF 31
Tabela 3 – Quantidade de mutações por paciente 32
Tabela 4 – características dos pacientes triplo-negativos 32
Tabela 5 – Características dos 27 pacientes triplo-negativos 33
Tabela 6 - Taxa de crescimento de cariótipos de medula óssea e fatores de risco estudados 34
Tabela 7 – Taxa de crescimento de cariótipos de sangue periférico e fatores de risco estudados 35
Tabela 8 – Descrição das alterações de cariótipos encontradas 36
Tabela 9 – Distribuição dos vários escores prognósticos estudados entre os 230 pacientes com MF 43

Tabela 10 – Comparação entre DIPSS *vs* DIPSS *plus*..... 44
Tabela 11 – Comparação entre MIPSS70 *e* IPSS 45
Tabela 12 – Comparação entre MIPSS70 *plus e* DIPSS *plus* 45
Tabela 13 – Comparação entre MIPSS70 *plus* e MIPSS70 *plus* 2.0 46
Tabela 14 – Comparação entre GIPSS *e* DIPSS *plus* 47
Tabela 15 – Comparação entre GIPSS e MIPSS70 *plus* 47
Tabela 16 – Comparação entre MYSEC e DIPSS *plus* …… 48
Tabela 17 – análise univariada de fatores de risco para sobrevida …… 50
Tabela 18 – Análise multivariada de fatores de risco para sobrevida …..…….. 52
Tabela 19 – Sobrevida comparativa de pacientes mutados para SRSF2 e não mutados …….…… 53
Tabela 20 – Sobrevida estratificada pelo IPSS …….. 54
Tabela 21 – sobrevida estratificada pelo DIPSS …… 55
Tabela 22 – sobrevida estratificada pelo DIPSS *plus* …… 56
Tabela 23 – Sobrevida estratificada pelo MIPSS70 …….. 57
Tabela 24 – Sobrevida estratificada pelo MIPSS70 *plus* 2.0 …… 58
Tabela 25 – Sobrevida comparada de pacientes com MFP e MF-PV e MF-TE. 59
Tabela 26 – Sobrevida estratificada por triplo-negativos …….. 60
Tabela 27 – Sobrevida comparativa de pacientes que utilizavam ruxolitinibe e aqueles que não utilizavam 61
Tabela 28 – Distribuição do IPSS e DIPSS *plus* nos vários estudos 72
Tabela 29 – Distribuição do MIPSS70 *plus* / MIPSS70 *plus* 2.0 nos vários estudos 74

Figuras:

Figura 1 – Curva de sobrevida global …….. 49
Figura 2 – Análise multivariada de fatores de risco para sobrevida …….. 52
Figura 3 - Curva de sobrevida em mutados e não mutados para SRSF2 …….. 53

Figura 4 – Curva de sobrevida estratificada pelo IPSS …… 54

Figura 5 – Curva de sobrevida estratificada pelo DIPSS …….. 55

Figura 6 – Curva de sobrevida estratificada pelo DIPSS *plus* …… 56

Figura 7 – Curva de sobrevida estratificada pelo MIPSS70 …….. 57

Figura 8 – Curva de sobrevida estratificada pelo MIPSS70 *plus* 2.0 …….. 58

Figura 9 – Curva de sobrevida comparando MFP e MF-PV / MF-TE 59

Figura 10 – Curva de sobrevida comparando pacientes triplo-negativos e não triplo-negativos 60

Figura 11 – Curva de sobrevida comparando pacientes que utilizavam ruxolitinibe e aqueles que não utilizavam 61

Tavares RS. *Caracterização clínica, citogenética e molecular de pacientes brasileiros com mielofibrose primária e mielofibrose pós-policitemia vera e pós-trombocitemia essencial* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A mielofibrose (MF) é a neoplasia mieloproliferativa (NMP) de maior gravidade, com uma sobrevida muito variável, podendo ser além de 20 anos a menos de 2 anos. O único tratamento curativo é o transplante alogénico de medula óssea (TMO), mas este está restrito a pacientes com idade menos avançada e relacionado uma mortalidade e a uma recaída da doença significativas. A caracterização prognóstica adequada é essencial para a tomada de decisão terapêutica, e os índices prognósticos modernos que utilizam dados moleculares e citogenéticos vêm substituindo os índices clássicos. Foram avaliados os dados clínicos e laboratoriais, estudou-se o cariótipo de medula óssea e de sangue periférico, e pesquisou-se as mutações *BCR-ABL1*, *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *U2AF1*, e aplicados os índices clássicos IPSS, DIPSS, DIPSS *plus*, e os mais recentes MIPSS70, MIPSS70 *plus*, MIPSS 70 *plus* 2.0, GIPSS e MYSEC-PM, a uma população de 230 pacientes de 8 instituições brasileiras com mielofibrose primária (MFP) e mielofibrose secundária a policitemia vera (PV-MF) e trombocitemia essencial (TE-MF), e comparados entre si. A comparação dos índices prognósticos entre si identificou uma maior acurácia dos índices prognósticos que utilizam dados mutacionais e citogenéticos sobre os índices prognósticos clássicos. Na análise univariada idade avançada, sexo masculino, tamanho do baço, mutação *SRSF2*, pacientes triplo-negativos, a estratificação pelo IPSS, DIPSS e DIPSS *plus*, MIPSS70 alto risco e MIPSS70 *plus* alto e muito alto risco mostraram impacto na sobrevida. Na análise multivariada status triplo-negativo e estratificação pelo IPSS mantiveram significância como fatores de risco para sobrevida. Este é o maior estudo brasileiro de pacientes com MF avaliando estas variáveis.

Descritores: Mielofibrose; Fatores de risco; Cariótipo; Mutação; Sobrevida; Neoplasias.

Comentado [IF3]: Não use ponto após a palavra "essencial" no título;

Mantenha apenas "tese" entre colchetes e com inicial minúscula.

Comentado [IF4]: Use no plural: Neoplasias

Após o último descritor, use ponto final.

Tavares RS. *Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of Brazilian cohort patients with primary myelofibrosis and myelofibrosis post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Myelofibrosis (MF) is the most severe myeloproliferative neoplasia (MPN), with a very variable survival, which can be beyond 20 years to less than two years. The only curative treatment is allogeneic bone marrow transplantation (ABMT), but this is restricted to patients of less advanced age and is associated with significant mortality and disease relapse. Adequate prognostic characterization is essential for therapeutic decision-making, and modern prognostic indexes using molecular and cytogenetic data have been replacing the traditional indexes. Clinical and laboratory data were evaluated, bone marrow and peripheral blood karyotype were studied, and *BCR-ABL*1, *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *U2AF1* mutations were investigated. The classic IPSS, DIPSS, DIPSS plus, and the most recent MIPSS70, MIPSS70 plus, MIPSS 70 plus 2.0, GIPSS, and MYSEC-PM indexes were applied to a population of 230 patients from 8 Brazilian institutions with primary myelofibrosis (MFP) and secondary myelofibrosis polycythemia vera (PV-MF) and essential thrombocythemia (TE-MF) and compared among themselves. Comparing the prognostic indexes with each other identified a greater accuracy of the prognostic indexes that use mutational and cytogenetic data on the classic prognostic indexes. In the univariate analysis, advanced age, male gender, spleen size, *SRSF2* mutation, triple-negative patients, IPSS, DIPSS and DIPSS plus estratification, MIPSS70 high risk and MIPSS70 plus high and very high risk showed impact in survival. In the multivariate analysis, triple-negative for JAK2 V617F, CARL, and MPL and stratification by IPSS maintained significance as risk factors for overall survival. The present study is the most extensive Brazilian cohort study of patients with MF evaluating these variables.

Descriptors: Myelofibrosis; Risk factors; Karyotype; Mutation; Survival; Neoplasms.

Comentado [IF5]: Não use ponto após a palavra “*thrombocythemia*” no título;

Mantenha apenas “thesis” entre colchetes e com inicial minúscula;

Neste caso, os nomes da faculdade e universidade devem ficar entre aspas duplas.

Comentado [IF6]: Use: Risk factors
Substitua “Neoplasia” POR “Neoplasms”

Após o ultimo descritor use ponto final.

1. **INTRODUÇÃO**

A primeira descrição de uma neoplasia mieloproliferativa (NMP) ocorreu no século dezenove, há mais de 170 anos.(1) Já o seu conceito foi determinado por William Dameshek em 1951, há 68 anos, e englobava a leucemia mieloide crônica (LMC), a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE), a mielofibrose primária (MFP), e a eritroleucemia. (1) Cerca de dez anos depois foi descrito o cromossomo Philadelfia (Ph), permitindo diferenciar as NMPs entre "Ph positivas" e "Ph negativas".(2)

Apesar de mais de 150 anos de história, somente em 2005 foi descrita a mutação *JAK2 V617F*. A família de enzimas *JAK* inclui as enzimas *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* e *TYK2*. Essas moléculas se ligam aos domínios citosólicos dos receptores de citocinas, e são essenciais para a sinalização através de citosina e fatores de crescimento. A *JAK2* é a única delas capaz de mediar a sinalização através dos três receptores mieloides (receptores de eritropoetina, trombopoetina e coestimelante do fator de crescimento granulocítico). A mutação *JAK2 V617F* é o resultado de uma troca de uma guanina por timina no nucleotiídeo 1848 do exon 14 do gene *JAK*, levando a uma substituição de uma valina por uma fenilalanina no códon 617. Esta mutação resulta em uma desregulação independente de ligande da atividade quinase *JAK2*, resultando no processo mieloproliferativo. (3-7)

Seguiu-se a descrição da mutação *MPLW515L* em 2006, resultado de uma troca de guanina por timina no nucleotídeo 1544, ocasionando numa substituição de um triptofano por uma leucina no códon 515. O gene MPL está localizado no cromossomo 1p34, e codifica o receptor de trombopoetina, o qual sinaliza através da enzima *JAK2*, sendo essencial para a megacariopoiese. Outras substituições com ganho de função no exon 10 do gene MPL foram descritas, resultando na troca do triptofano no códon 515 por lisina, arginina, alanina, e correspondendo às mutações *W515K, W515R,* e *W515A*, respectivamente. Essas mutações ativam a via *JAK/STAT* de maneira

independente de citocinas, também originado NMPs, especialmente a TE e a MF.(7-9)

Em 2013 identificou-se mutações no exon 9 do gene da Calreticulina (CALR), tanto através de deleção de 52 pares de base (pb) (L367fs*46), denominada como tipo 1, ou *CALR1*, como inserções de 5-pb TTBTC (p.K385fs*47), denominada tipo 2, ou *CALR2*. Todas as variantes genéticas da *CALR* causam uma perda de sequência de 27 aminoácidos, com consequente perda de função da proteína *CALR*. Esta proteína mutante ativa a quinase JAK2 através do receptor de trombopoetina. (7, 10, 11)

Estas três mutações foram definidas como mutações "*driver*" (denominadas "diretoras" daqui em diante) das NMPs, ou seja, promotoras do processo mieloproliferativo, e são praticamente mutualmente exclusivas entre si. Sua descrição permitiu uma compreensão fisiopatológica bem mais precisa das NMPs, um refinamento na sua classificação e no seu diagnóstico, assim como o desenvolvimento de novas abordagens clínicas e terapêuticas, as quais vêm se aprimorando e renovando rapidamente com o passar dos últimos anos.(12, 13)

A Mielofibrose Primária (MFP) é dentre as NPM Ph negativas, também referidas como NMPs BCR-ABL negativas, ou ainda NMPs *JAK2* positivas, de maior gravidade, sendo caracterizada por uma proliferação predominantemente megacariocítica e granulocítica na medula óssea, estando associada a uma deposição reativa de tecido conectivo fibroso e a hematopoiese extramedular. (14, 15) Sua incidência aproximada é de 1.5 a cada 100.000 habitantes, e geralmente afeta indivíduos com idade mais avançada, mas também pode ser encontrada em indivíduos jovens.(16-18) A sobrevida média de pacientes portadores de MF atualmente é estimada em 6 anos, mas é altamente variável entre os indivíduos, sendo que alguns falecem logo após o diagnóstico, enquanto outros podem sobreviver mais de duas décadas.(19-23) As principais causas de óbito são transformação para leucemia aguda, insuficiência medular e complicações advindas de trombose, sangramentos, infeções ou hipertensão portal.(24)

Diferente da LMC, a MF não é caracterizada pela presença de uma anormalidade cromossômica recorrente. Por volta de 60% dos pacientes com MP apresenta a mutação *JAK2 V617F*, 20% alterações no exon 9 do gene *CALR*, e cerca de 3 a 10% a mutação no gene *MPL*. Essas mutações estão presentes em 90% dos casos.(10, 11) Cerca de 10% dos pacientes não apresentarão nenhuma dessas alterações, sendo denominados como triplo-negativos (TN), e apresentam pior prognóstico.(25)

Outras mutações somáticas de regulação epigenética também têm sido encontradas com grande frequência na MF (*ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1/2, TET2, DNMT3A, U2AF1*, entre outras), tendo impacto clínico e prognóstico. Mas não só a presença dessas mutações, mas também o número presente das mesmas demonstrou impacto prognóstico.(26-28)

Dentre todas as NPMs, a MF também é a que apresenta a maior variabilidade clínica. Essa apresentação varia conforme as diferentes configurações do sinal de transdução anormal, resultante de um espectro de mutações afetando proteínas tirosino-quinases e moléculas relacionadas, mas geralmente ao diagnóstico apresenta alterações hematológicas em sangue periférico e esplenomegalia.(12, 29, 30)

A sintomatologia é variável e pode ser bastante significativa, com sintomas constitucionais (febre, perda de peso e sudorese noturna), fadiga desproporcional à anemia, caquexia, trombose, sangramentos, prurido, infartos esplênicos, dores ósseas, entre outros. A hematopoiese extramedular pode acometer não só fígado e baço, mas também vários outros órgãos e tecidos, podendo ser assim responsável por outras manifestações clínicas menos comuns.(24)(31)

A alteração mais comumente encontrada é a anemia, sendo também muito comuns a leucocitose às custas de neutrofilia, e alterações plaquetárias como plaquetose ou plaquetopenia. As citopenias, quando presentes, se devem a uma eritropoiese ineficaz e/ou à fibrose medular. Tanto a esplenomegalia como a hepatomegalia são consequentes à hematopoiese extramedular.(31)

O diagnóstico da MFP atualmente é feito seguindo-se os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2016.(12) A MFP ainda é classificada

em Mielofibrose Préfibrótica e Fibrótica.(12) O diagnóstico de Mielofibrose Secundária à Policitemia Vera (MF-PV) e Secundária a Trombocitemia Essencial (MF-TE) obedecem os critérios do *International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment - IWG-MRT* - vide anexo 1.(32) Embora estas sejam indistinguíveis do ponto de vista clínico e anatomopatológico da MFP, algumas evidências sugerem ter um prognóstico mais favorável.(15, 33)

As decisões terapêuticas na MF são desafiadoras. Atualmente seu tratamento consiste em medidas e terapias de suporte, uso de inibidores da via *JAK/STAT*, e Transplante Alogénico de Medula Óssea (TMO-A). O TMO-A é o único tratamento com potencial curativo e que já demonstrou inequivocamente mudar o curso natural da doença. Embora venham sendo obtidos progressos consideráveis, ele ainda está associado na MF a uma mortalidade relacionadas ao procedimento elevada, e uma sobrevida livre de doença em 5 anos baixa, tanto em transplantes com doadores relacionados como não relacionados, mesmo se utilizando regimes de condicionamento menos intensivos.(34, 35) Ainda, os benefícios em relação ao tratamento clínico ainda são notados nos pacientes com DIPSS / DIPSS *plus* mais elevados, sendo que poucos estudos avaliaram os resultados com os índices prognósticos com dados moleculares.(36-38) A definição prognóstica baseada em dados moleculares e citogenéticos como ferramenta para tomada de decisão vem paulatinamente sendo incorporada.(13, 38, 39)

1.1 Escores prognósticos clássicos na MFP

Ao longo dos últimos 13 anos os escores prognósticos vêm incorporando tanto características clínicas como alterações laboratoriais, cariotípicas e genéticas, e assim sendo cada vez mais acurados em separar os pacientes em grupos prognósticos distintos, com impacto significativo nas decisões terapêuticas.(13)

Os escores prognósticos mais antigos envolviam número pequeno de pacientes e estes eram na quase sua totalidade oriunda de um único centro, e falharam em distinguir adequadamente grupos de prognóstico intermediário.(40-44)

Em 2009 um estudo conduzido pelo *IWG-MRT* avaliou 1054 pacientes portadores de MFP tratados em 7 centros de referência. Pacientes portadores de MF-PV e MF-TE, assim como aqueles que estariam no chamado “estado pré-fibrótico”, não foram incluídos. Após análise multivariada, cinco fatores presentes ao diagnóstico foram identificados como de importância prognóstica: idade acima de 65 anos, presença de sintomas constitucionais, hemoglobina menor que 10 g/dL, contagem leucocitária acima de 25 x 10^9/L, e percentual de blastos em sangue periférico igual ou maior que 1%. Para cada um destes fatores encontrados foi atribuído um ponto, sendo possível se identificar 4 subgrupos prognósticos principais: favorável (escore 0), intermediário 1 (escore 1), intermediário 2 (escore 2) e alto risco (escore >= 3), com uma sobrevida média variando entre 135, 95, 48 e 27 meses, respetivamente. Criou-se assim o escore prognóstico internacional - *international prognostic scoring system* (IPSS).(20)

Para se estudar o impacto prognóstico das alterações clínicas e laboratoriais identificadas no IPSS e que fossem adquiridas ao longo da doença, o mesmo grupo colaborativo internacional IWG-MRT avaliou 525 pacientes portadores de MFP acompanhados regularmente (mínimo de 3 visitas ao ano). Neste estudo a presença de anemia significativa (Hb < 10 g/dL) teve o dobro do impacto encontrado no IPSS, sendo então atribuído 2 pontos para esta variável. Os outros fatores de risco (idade, contagem leucocitária maior que 25 x 10^9/L, percentagem de blastos em sangue periférico igual ou maior que 1% e idade maior que 65 anos) também se mostraram significativos e receberam um ponto no escore. Foram assim definidos 4 grupos prognósticos distintos, sendo baixo risco (escore 0), risco intermediário I (escore 1 a 2), risco intermediário II (escores 3 e 4) e alto risco (escore 5) com curvas de sobrevida significativamente diferentes das encontradas ao IPSS, ficando conhecido como escore prognóstico internacional dinâmico - *dynamic international prognostic scoring system* (DIPSS). Desta maneira criou-se um escore prognóstico que poderia ser aplicado a qualquer momento do seguimento, conseguindo avaliar o peso de mudanças adquiridas ao longo do tempo, e permitindo inclusive avaliar pacientes mesmo sem ter todas as informações da época do diagnóstico disponíveis.(21)

Outros fatores com impacto clínico importante foram identificados, como a presença de plaquetopenia, necessidade transfusional e alterações cariotípicas.(45-48). Assim, um novo estudo incorporando esses parâmetros ao DIPSS foi realizado, avaliando retrospetivamente 793 pacientes com MFP atendidos na Clínica Mayo entre 1970 e 2009. Neste estudo, pacientes com cariótipo de medula óssea disponíveis foram analisados, sendo criados dois grupos: um grupo "treino" (pacientes admitidos dentro do primeiro ano de diagnóstico), onde o escore seria desenvolvido, e um grupo "teste" (pacientes admitidos após um ano de diagnóstico). Após análises uni e multivariada, e aplicação no grupo "treino" e posterior validação no grupo "teste", um novo escore foi obtido. Atribuiu-se um ponto para aqueles que apresentassem DIPSS intermediário I, para cariótipo desfavorável que incluiria cariótipo complexo ou uma a duas anormalidades incluindo +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p-, inv(3), ou rearranjo 11q23), para contagens plaquetárias menores que 100 x 10^9/L e para Necessidade transfusional. Pacientes que apresentavam DIPSS 2 receberam 2 pontos, e os com DIPSS de alto risco receberam 3 pontos. Desta maneira, quatro grupos prognósticos foram encontrados: baixo risco (escore 0), risco intermediário I (escore 1), risco intermediário II (escores 2 e 3) e alto risco (escores 4 a 6), com sobrevida média de 185, 78, 35 e 16 meses, respetivamente. Este escore foi denominado então como escore prognóstico internacional dinâmico revisado – *revised dynamic international prognostic scoring system* (DIPSS *plus*). Esta nova estratificação obtida pelo DIPSS *plus*, quando comparada ao DIPSS obtido no mesmo grupo de pacientes, se mostrou mais precisa. (22)

1.2 O impacto prognóstico das alterações moleculares e outras alterações de cariótipo

Várias alterações moleculares têm mostrado impacto prognóstico importante em várias neoplasias mieloides, incluindo a MF. Nesta doença essas mutações ocorrem com uma frequência bastante alta e inclusive em associação.(26, 28)

Um estudo internacional colaborativo envolvendo 879 pacientes com MFP, sendo 483 europeus e 396 da Clínica Mayo, avaliou mutações nas regiões *EZH2, TET2, DNMT3A, CBL, ASKL1, IDH1, IDH2, SRSF2, MPL* e *JAK2*. No grupo de pacientes europeus a presença de mutações em *ASXL1*, *SRSF2* e *EZH2* foi associada independentemente com uma menor sobrevida, sendo que apenas a *ASXL1* se mostrou independente em relação ao IPSS. Esses achados foram validados na coorte da Clínica Mayo, sendo que apenas as mutações em *ASXL1* permaneceu independente do DIPSS *plus*. Em relação a sobrevida livre de transformação leucémica, as mutações em *ASXL1*, *SRF2* e *IDH1/2* influenciaram negativamente na coorte europeia, e na coorte da Clínica Mayo foram as mutações *SRSF2* e *IDH1*. Foi definida uma categoria de mutações conhecidas como de alto risco molecular (HMR) e definidos grupos de pacientes com um alto risco para morte prematura ou transformação leucémica, baseada na presença de pelo menos uma das seguintes mutações: *ASXL1, SRSF2, IDH1/2* e/ou *EZH2*.(26)

Outro estudo com pacientes da Clínica Mayo e de outros centros europeus com 797 pacientes avaliaram a presença de mutações nas regiões *ASXL1, EZH2, SRF2, IDH1/2* e *CALR*. No grupo de pacientes europeus a presença de duas ou mais regiões mutadas predizeram uma pior sobrevida, com uma média de 2,6 anos contra 7 anos para aqueles com apenas uma mutação, e 12,3 anos para aqueles sem nenhuma das regiões mutadas. Estes resultados foram validados na coorte da Clínica Mayo, sendo os resultados independentes do ponto de vista estatístico tanto do IPSS como do DIPSS *plus*. Pacientes com duas ou mais mutações tiveram uma sobrevida livre de transformação leucémica menor, e a presença de mutações na região CALR favoreceu a sobrevida.(27)

O estudo do DIPSS *plus* utilizou as alterações cariotípicas de mau prognóstico definidas previamente por um estudo com 433 pacientes com MFP.(48) Posteriormente, uma análise de 1002 pacientes com MFP e resultado de cariótipo de medula óssea disponível identificou três grupos prognósticos distintos baseado em suas características citogenéticas: “muito alto risco” – anormalidades isoladas ou múltiplas de −7, i(17q), inv(3)/ 3q21, 12p−/12p11.2, 11q−/11q23, ou outras trissomias autossômicas não incluindo + 8/ + 9 (ex.: +21,

+19); “favorável” – cariótipo normal ou alterações isoladas do 13q−, +9, 20q−, translocação ou duplicação do cromossomo ou anormalidades cromossômicas incluindo -Y; e “desfavorável” – todas as outras anormalidades. A sobrevida média foi de 1.2 (HR 3.8, 95% CI 2.9-4.9), 2,9 (HR 1.7, 95% CI 1.4 – 2,0) e 4.4 anos para as categorias de “muito alto risco”, “desfavorável” e “favorável”, respectivamente.(49) Esta estratificação serviu como referência para os escores MIPSS70 *plus* (utilizando apenas dois grupos: “favorável” e “desfavorável”), e MIPSS70 *plus* 2.0 e GIPSS (já utilizando os três grupos, só completamente definidos após a publicação do estudo do MIPSS70/MIPSS70 *plus*), escores descritos a seguir. (23, 50, 51)

Um estudo multicêntrico, com coortes de treino e validação de pacientes com MFP integrou dados clínicos com informações citogenéticas e moleculares, além de graduação de fibrose de medula óssea, teve como objetivo desenvolver um novo escore prognóstico, enfocando pacientes abaixo de 70 anos, idade compatível com indicação de TMO-A segundo os *guidelines* da época. O estudo incluiu 805 pacientes com MFP com 70 anos de idade ou menos, e identificou nove variáveis, incluindo três genéticas: ausência de mutação tipo *CARL1*, presença de alterações moleculares de alto risco (*ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1* e *IDH2*), e presença de duas ou mais alterações moleculares de alto risco. As alterações clínicas de risco são Hb < 10 g/dL, leucócitos totais > 25 x 10^9/L, 2% ou mais de blastos em sangue periférico, presença de sintomas constitucionais, grau de fibrose medular igual ou maior que 2. Este escore permitiu estratificar estes pacientes em três grupos prognósticos: baixo grau (escores 0 e 1), risco intermediário (escores 2 a 4) e alto risco (escore 5 ou superior), com sobrevida média de 27,7 anos a “não atingida”, 6.3 a 7.1 anos, e 2.3 a 3.1 anos, respetivamente. O escore foi denominado escore prognóstico internacional mutacional - *mutation-enhanced international prognostic scoring system* (MIPSS70).(23)

Para se apreciar o valor de se adicionar os dados citogenéticos ao sistema MIPSS70, foram analisados no mesmo estudo os casos em que tanto as informações moleculares como de cariótipo estivessem disponíveis. Foram consideradas as mesmas variáveis do MIPSS70 e incluída presença ou ausência

de cariótipo desfavorável, segundo a classificação determinada por Tefferi A e cols. naquele mesmo ano.(49) Desta vez foram identificadas sete variáveis, ganhando um ponto Hb < 10 g/dL, identificação de 2% ou mais de blastos em circulação, presença de sintomas constitucionais, presença de uma HMR (*ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1* e *IDH2*), e dois pontos ausência de mutação tipo *CARL1*, presença de duas ou mais HMR, e três pontos para presença de cariótipo desfavorável. Este escore permitiu estratificar estes pacientes em quatro grupos prognósticos: baixo grau (escore 0 a 2), risco intermediário escore 3), alto risco (escore 4 a 6) e muito alto risco escore 7 ou superior), onde a sobrevida em 5 anos foi de 91%, 66%, 42% e 7%, respetivamente. Este escore foi denominado de escore prognóstico internacional mutacional revisado - *karyotype-enhanced mutation-enhanced international prognostic scoring system* (MIPSS70 *plus*). Apesar de terem sido desenvolvidos com o objetivo de se prognosticar pacientes menores de 70 anos, neste estudo também foi demonstrado ser acurado em pacientes acima de 70 anos.(23)

Observou-se uma discrepância significativa quando se comparou o MIPSS70 ao IPSS, especialmente em relação a pacientes considerados de alto risco, onde em apenas 54% dos casos houve concordância. Em relação ao MIPSS *plus*, 10,2% dos casos classificados como risco baixo ou intermediário pelo DIPSS *plus* foram agora classificados com de alto risco e muito alto risco, e 19,8% dos casos classificados como intermediários 2 desceram de categoria de risco.(23)

O MIPSS70 *plus* não levou em consideração outros fatores prognósticos ainda não bem determinados na época de sua publicação, como um refinamento na estratificação de cariótipos em “alto risco” e “muito alto risco”, ainda não bem definida na época de sua publicação, o efeito deletério da mutação *U2AF1Q157*, e os novos níveis de hemoglobina ajustados para o sexo, classificando a anemia em “moderada” e “severa”.(49, 52, 53) Assim, foram incorporadas estas três variáveis no coorte de casos participantes do estudo MIPSS70/MIPSS70 *plus*, onde estas informações estavam disponíveis, sendo obtido o escore prognóstico internacional mutacional revisado versão 2.0 - *karyotype-enhanced mutation-enhanced international prognostic scoring system 2.0* (MIPSS70 *plus* 2.0). Este

índice é composto de cinco variáveis citogenéticas/moleculares, como cariótipo de muito alto risco (4 pontos), cariótipo desfavorável (3 pontos), duas ou mais mutações de alto risco (3 pontos), presença de uma mutação de alto risco (2 pontos), ausência de mutação do tipo *CARL1* (2 pontos), e quatro clínicas, sendo estas sintomas constitucionais (2 pontos), anemia severa ajustada pelo sexo (< 8,0 g/dl em mulheres e < 9.0 g/dl em homens (2 pontos), anemia moderada (8,0 – 9,9 g/dl em mulheres e 9,0-10,9 g/dl em homens (1 ponto), e blastos circulantes igual ou maior que 2% (um ponto). Foram assim encontradas 5 categorias de risco: muito alto risco – 9 ou mais pontos, alto risco (5 a 8 pontos), risco intermediário (3 a 4 pontos), baixo risco (1 a 2 pontos), e muito baixo risco (zero pontos), sendo que em pacientes menores que 70 anos a sobrevida média correspondente foi de 1,8 anos (<5%), 4,1 anos (13 %) 7,7 anos (37%) 16,4 anos (56%), e "média não alcançada" (2%) respectivamente.(50)

O MIPSS70 *plus* 2.0 permitiu um refinamento ainda maior do MIPSS70 *plus*, como por exemplo reclassificando 25% dos pacientes incluídos na categoria de "alto risco" no MIPSS70 *plus* para a categoria de "muito alto risco" do MIPSS70 *plus* 2.0.(50)

O escore prognóstico genético - *genetically inspired prognostic scoring system* (GIPSS) foi obtido através de um estudo colaborativo entre a Clínica Mayo e a Universidade de Florença, onde 641 pacientes com MFP foram estudados, sendo desenvolvido um índice prognóstico utilizando exclusivamente alterações mutacionais e cariotípicas, sem utilizar dados clínicos. Foram identificados como fatores de risco independentes para sobrevida: cariótipo de alto risco (2 pontos), cariótipo desfavorável (um ponto), ausência de mutações tipo *CARL1* (1 ponto), presença da mutação *ASXL1* (um ponto), *SRSF2* (1 ponto), e *U2AF1Q157* (1 ponto). Quatro categorias de risco foram definidas: baixo risco (0 pontos), intermediário 1 (1 ponto), intermediário 2 (2 pontos) e alto (3 ou mais pontos), com sobrevida média de 26,4 anos, 8 anos, 4,2 anos e 2 anos, respectivamente. Trata-se de um escore de baixa complexidade e cujos fatores a serem utilizados para seu cálculo não são modificados pela terapia medicamentosa.(51) Quando comparado ao MIPSS70 *plus*, o GIPSS apresenta um alinhamento satisfatório dos seus grupos "baixo" e "alto risco", mas nos

grupos de risco “intermediário 1” e “intermediário 2”, cerca de 20% seriam reclassificados como de “alto risco” pelo MIPSS70 *plus*.(51)

Uma vez que os escores prognósticos para MFP não incluíam pacientes com MF-PV e MF-TE, foi estudado um modelo prognóstico específico para as PMF-PVs e MF-TEs, o escore prognóstico para mielofibrose secundária a policitemia vera e trombocitemia essencial, o *myelofibrosis secondary to PV and ET-prognostic model* (MYSEC-PM). Foram coletados dados de 781 pacientes com MF-TE (333) e MF-PV (352) de 16 centros, e estudados 685 casos onde o fenótipo das mutações diretoras estava disponível. Como o cariótipo foi encontrado em apenas 340 pacientes, este fator de risco não foi incorporado na análise final, assim como outras mutações somáticas não diretoras, ou mesmo as HMR. Foram determinados como fatores de risco para sobrevida e atribuídos pontos para cálculo do escore: hemoglobina menor que 11,0 g/dL (2 pontos), contagem de blastos em sangue periférico igual ou maior que 3% (2 pontos), ausência de mutação *CALR* (2 pontos), contagem plaquetária < 150 x 10^9/L (1 ponto), presença de sintomas constitucionais (1 ponto), e idade (0.15 pontos por ano). Foram definidas quatro categorias de risco, obtidas plotando-se os valores obtidos em um nomograma (vide anexos): baixo risco, risco intermediário 1, risco intermediário 2 e alto risco, com sobrevida média não alcançada, 9,3 anos, 4,4 anos, e 2 anos, respetivamente.(33)

As mutações da via *RAS* são eventos frequentes em neoplasias mieloides. Um estudo de 723 pacientes com MF, oriundos de três centros, um deles brasileiro, encontrou em 6% dos casos variantes *N/KRAS*. Estas variantes foram associadas com aspetos clínicos e laboratoriais de doença mais avançada, e uma menor sobrevida. Um novo escore foi proposto, com 8 variáveis, sendo elas idade > 65 anos (1 ponto), Hb < 10 g/dL (1 ponto), contagem plaquetária < 100 x 109/L (1 ponto), necessidade transfusional (1 ponto), alterações cromossômica nos cromossomos 5, 7, 17 ou cariótipo complexo (1 ponto), TN (2 pontos), presença de mutações de alto risco *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* (1 ponto), e mutações *N/KRAS* (2 pontos). Foram definidos 3 grupos prognósticos: baixo (0 – 2 pontos), Intermediário (3 – 4 pontos), alto (5

ou mais pontos), com sobrevida média de três anos de 74%, 50% e 16%, respetivamente.(54)

Um outro modelo envolveu o sequenciamento genético de 69 genes em 2035 pacientes com NMP, sendo 309 com MFP. Um escore envolvendo informações clínicas, resultado de hemograma e possíveis alterações genéticas foi desenvolvido, estando disponível a calculadora *(MPN personalized risk calculator)* on-line para o cálculo: https://cancer.sanger.ac.uk/mpn-multistage/. Este escore pretende personalizar o escore dos pacientes de uma maneira personalizada, envolvendo um número de parâmetros muito maior que os anteriores.(55)

Para se avaliar os desfechos após o TMO-A, outro escore, O MTSS (*Myelofibrosis Transplant Scoring System*) foi obtido após estudar 360 pacientes com MFP e MF-PV e MF-TE que foram submetidos a TMO-A. Variáveis clínicas e moleculares (*JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *IDH1/2*, *CBL*, *DNMT3A*, *TET2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *EZH2*, *TP53*, *NRAS*, *KRAS*, *RUNX1* e *FLT3A*) foram estudadas. A análise citogenética estava disponível em 202 (60%) dos casos. As variáveis associadas negativamente de risco foram idade igual ou maior que 57 anos, escore de performance *Karnofsky* menor que 90%, contagem plaquetária menor que 150 x 10^9/L, contagem de leucócitos > 25 x 10^9/L, doador com incompatibilidade HLA, presença de mutação *ASXL1*, e ausência de mutação diretora *CARL* ou *MPL*. Quatro níveis prognósticos foram definidos: baixo risco (escore de 0 a 2), intermediário (escore 3 a 4), alto (escore 5) e muito alto (maior que 5), com sobrevida medida de 5 anos de 83%, 64%, 37% e 22%, respectivamente. (37)

Assim, a prognosticação através de índices mais modernos, utilizando dados genéticos e moleculares, vem sendo cada vez mais utilizada como guia terapêutico, especialmente em pacientes elegíveis para TMO-A. (13, 38, 39)

1.3 As particularidades do cariótipo na mielofibrose

A análise do cariótipo e sua incorporação aos escores prognósticos ma MFP é fundamental para se estratificar de maneira adequada esses pacientes,

uma vez que os índices que o utilizam apresentam uma acurácia significativamente maior quando comparados aos índices que não o utilizam. (22, 23, 51)

A análise do cariótipo em neoplasias hematológicas normalmente é feita com uma amostra de medula óssea (CMO). Entretanto, na MF a ocorrência de punções sem material adequado, chamadas de “punções secas”, é frequente, e estas podem impossibilitar o crescimento de metáfases e a análise morfológica. Além disso, a punção de medula óssea implica em custos e é um procedimento invasivo e doloroso, dificultando sua repetição nos casos de insucesso e sua utilização sequencial no seguimento dos casos.(56, 57)

A análise de cariótipo de sangue periférico (CSP) é certamente menos invasiva e dolorosa, e seu custo é menor. Os estudos com CSP em MF são escassos, mas dois estudos publicados sugerem que o exame é adequado para caracterização citogenética.(56, 58)

Um estudo com pacientes portadores de MFP demonstrou que a análise do cariótipo em sangue periférico seria adequada. Das 18 amostras colocadas em cultura, 12 apresentaram metáfases sendo que 7 com anormalidade citogenética clonal.(56)

Em um estudo prospetivo com 42 pacientes com MF foram coletados CMO e CSP e analisados utilizando-se citogenética convencional associada a um painel de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para as alterações citogenéticas mais comuns. Em dois casos não foi possível obter metáfases com CMO. Nestes dois casos, e num terceiro onde o CMO foi normal, foi possível se identificar alterações citogenéticas com significado prognóstico. Dos 17 (43%) casos onde se encontrou alterações citogenéticas, somente em 13 (33%) o FISH era potencialmente capaz de detetá-las. Independente da contagem de CD34 das amostras, houve concordância entre os resultados dos cariótipos obtidos de ambos os meios.(58)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários:

2.1.1 Caracterizar do ponto de vista clínico, molecular e citogenético pacientes portadores de MFP, MF-PV e MF-TE de 8 centros de referência no Brasil – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG), Hospital Santa Marcelina de São Paulo (H Sta Marcelina), Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-USP), Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), Instituto Hemomed Oncologia e Hematologia de São Paulo (HEMOMED), Santa Casa de Misericórdia São Paulo (Sta Casa SP), Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas (UNICAMP) e Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR).

2.1.2 Aplicar o escore prognóstico internacional (IPSS), o escore prognóstico dinâmico internacional (DIPSS), o escore prognóstico dinâmico internacional revisado (DIPSS *plus*), o escore prognóstico internacional mutacional (MIPSS70), o escore prognóstico internacional mutacional revisado (MIPSS70 *plus*), o escore prognóstico internacional mutacional revisada versão 2.0 (MIPSS70 *plus* 2.0), o escore prognóstico genético (GIPSS), em todos os casos

2.1.3 Aplicar o escore prognóstico para mielofibrose secundária a policitemia vera e trombocitemia essencial, o MYSEC-PM naqueles pacientes brasileiros portadores de MF-PV e MF-TE;

Comentado [C17]: o

2.1.4 Comparar os resultados dos diferentes escores prognósticos aplicados entre si e a importância desta diferença em nossos pacientes.

2.1.5 Avaliar a curva de sobrevida global, os possíveis fatores de risco associados a sobrevida e a sobrevida estratificada para os vários escores

2.2 Objetivos secundários:

2.2.1 Avaliar o grau de obtenção de metáfases adequadas à análise pelo cariótipo de sangue periférico desta população de pacientes

2.2.2 Avaliar a utilidade do cariótipo de sangue periférico em pacientes com MF

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo clínico, multicêntrico, prospetivo, observacional, de coorte. Oito instituições participaram das diferentes etapas do projeto: HC-UFG, H Sta Marcelina, HC-USP, HC-UFMG, HEMOMED, Sta Casa SP, UNICAMP e HC-UFPR. Os dados clínicos foram obtidos utilizando-se questionário pré-estabelecido (ANEXO 2). Os regimes de tratamento foram deixados a critério dos investigadores do estudo e padrões de tratamento locais, não sendo influenciados pelo estudo. Uma ficha clínica (CRF) em papel foi preenchida e os investigadores principais foram os responsáveis por coletar os dados. Estes dados foram obtidos e mantidos confidenciais, de forma que apenas o próprio(a) investigador(a) pôde coletar e acessar os dados de seus pacientes. O investigador coordenador do estudo também teve permissão para acessar os dados, sendo que a identificação de cada paciente foi feita por meio de suas inicias e números de identificação, assegurando a total privacidade e confidencialidade destes dados.

O período de recrutamento foi de fevereiro de 2016 a dezembro de 2019, sendo que após este período inserções ou correções só foram possíveis por meio de um formulário de esclarecimento de dados.

Os dados obtidos após o resultado de cariótipo de sangue periférico e estudo mutacional por sequenciamento de nova geração foram preenchidos pelo investigador principal, utilizando-se o formulário presente no anexo 4.

Foi considerado como último seguimento vivo aqueles pacientes que compareceram nos últimos três meses de consulta que antecederam janeiro de 2021 nos respetivos ambulatórios. Para todos aqueles que tivessem retornado antes de três meses foi realizado contanto telefônico e/ou revisão do prontuário e registado como vivo ou falecido, conforme a situação permitia. Para aqueles onde o contato telefônico não foi possível ou não havia registo de óbito no prontuário, foi considerado como perda de seguimento.

3.2 População de Pacientes

Foram recrutados 241 pacientes das 8 diferentes instituições supracitadas, e destes selecionados e estudados 230 casos.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

3.3.1 Critérios de inclusão

1. Idade igual ou maior que 18 anos
2. Pacientes com diagnóstico de MFP, MF-PV ou MF-TE, segundo os critérios da classificação da OMS de 2016 (ANEXO 1)
3. TCLE assinado antes de qualquer procedimento relacionado ao estudo

3.3.2 Critérios de exclusão

1. Diagnóstico de MFP ou MF-PV ou MF-TE duvidoso ou incompleto
2. Inabilidade pelo paciente de compreender os termos e disposições do estudo ou sua falta ou retirada de consentimento em participar.

3.4 Revisão do diagnóstico

Todos os diagnósticos foram revisados utilizando-se os dados clínicos, moleculares e citogenéticos e se aplicando os critérios da OMS de 2016.(12) Quando houve dúvida do diagnóstico do ponto de vista histopatológico, foram enviadas as lâminas e/ou os blocos de anátomo-patológico da época do diagnóstico para o Serviço de Patologia do Hospital da Clínicas da UFG, para revisão histológica. Este material foi identificado apenas pelo número utilizado para a identificação de cada paciente no estudo. Os laudos de cada revisor foram de conhecimento apenas do mesmo e do autor principal, o qual foi responsável pela sua inserção nas CRFs. Estes laudos foram utilizados exclusivamente para o estudo em questão e mantidos em sigilo para qualquer outro propósito. Os

casos em que o diagnóstico permaneceu duvidoso ou incorreto foram excluídos do estudo.

3.5 Análises citogenética e moleculares das amostras de sangue

3.5.1 Coleta e envio de amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas de 241 pacientes, após assinatura do termo livre esclarecido, o mesmo aprovado previamente pelos Comités de Ética em Pesquisa de cada instituição participante, e foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para análise molecular, e ao Laboratório *In Situs* em São Paulo para análise do CSP.

3.5.2 Extração do DNA genômico

A partir da amostra de sangue periférico coletada em tubo contendo anticoagulante EDTA, foi extraído o DNA genómico. Para isto foi utilizado o *PureLinkTM Genomic DNA Kits,* (Invitrogen ™, Life Technologies, CA, USA).

De todo sangue foram transferidos 200 µL para um tubo de polipropileno de 2 mL e acrescentados 200 µL do *PureLink Genomic Lysis/Biding Buffer* e 200 µL de proteinase K. Esta solução foi homogeneizada em um equipamento do tipo vortex e incubada em banho-maria a uma temperatura de 54ºC a 57ºC. Então, foram adicionados 200 µL de etanol 100% a este material lisado e homogeneizado em vortex por 5 segundos para obtenção de uma solução homogênea, de aspecto uniforme e pouco viscoso. Cerca de 640 µL do lisado foram pipetados em uma coluna PureLink™ Spin Column e esta foi centrifugada a 12.900 rcf por 1 minuto a temperatura ambiente.

A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e adicionados 500 µL do tampão Wash Buffer 1 (preparado com etanol). Então, a solução foi novamente centrifugada a 12.900 rcf por 1 minuto a temperatura ambiente. A coluna será novamente transferida para um novo tubo coletor e nela foram

adicionados 500 µL do tampão Wash Buffer 2 (preparado com etanol). A coluna foi então centrifugada a por 3 minutos a temperatura ambiente. Por fim, a coluna foi transferida para um novo tubo de polipropileno e pipetados 50 µL de água Mili-Q ultrapura sobre ela, que foi então centrifugada 16.100 rcf por 1 minuto e depois descartada. O DNA ficou contido no tubo de polipropileno e resuspenso em 30 µL do tampão de diluição fornecido no Kit de extração.

3.5.3 Quantificação e integridade do DNA

A concentração do DNA foi determinada através do equipamento NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) nos comprimentos de onda 260/280, respetivamente. A integridade da amostra de DNA foi confirmada em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo. As amostras de DNA foram armazenadas a -20ºC até posterior uso.

3.5.4 Sequenciamento da amplificação refratária à mutação (ARMS) para *JAK*2 V617F

A técnica de ARMS foi utilizada na identificação de mutação no *JAK2 V617F*. Resumidamente, a reação compreendeu dos seguintes reagentes: 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador externo (F: 5' TCC TCA GAA CGT TGA TGG GAG 3'; R: 5' ATT GCT TTC CTT TTT CAC AAG AT 3') 0,5µM de oligonucleotídeos iniciadores marcados com FAM específicos para a mutação e forma selvage respectivamente (F: 5’ GCA TTT GGT TTT AAA TTA TGG AGT ATA TG 3'; R: 5' GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA AAA 3'), 25ng de DNA, 10mM de dNTP, 50mM de $MgCl_2$, tampão da enzima (10X), 1U da enzima DNA polimerase *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) e água estéril até o volume de 20µL. A reação foi submetida às seguintes condições de tempo e temperatura: aquecimento inicial de 95ºC por 11 minutos, 35 ciclos de 94ºC por 30 segundos, 56,2ºC por 1 minuto e 72ºC por 2 minutos, seguidos por um aquecimento de 94ºC por 30 segundos e uma extensão final de 60ºC por 45 minutos. Para a realização da análise dos fragmentos foi utilizado 1,5 µL do produto de PCR, 0,25 µL GeneScan™ 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems, Warrington, UK) e 8,25 µL Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems,

Foster City, CA, EUA) e submetido à eletroforese capilar em um Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando protocolo padrão e posteriormente analisado com programa Gene Mapper ID V3.2 (Biosystems, Foster City, CA, EUA). (59)

Os fragmentos esperados, após à análise, com 230 pb representam o alelo selvagem e os fragmentos com 277 pb representam o alelo mutado.

3.5.5 Identificação das mutações em *CARL*

As identificações de mutações no exon 9 do gene *CARL* foram através da técnica de análise de fragmentos. Resumidamente,10 ng de DNA genômico foram amplificadas com o seguinte protocolo: 5 µL de Tampão de Reação 10 X, 1µL dNTP 10nM, 3µL $MgCl_2$ 50mM, 2,5µL de cada um dos primers a 10pmol, sendo o primer F marcado com FAM (5' GGC AAG GCC TGA GGT GT 3') e o R sem marcação (5' GGC CTC AGT CCA GCC CTG 3'), 0,2 µL enzima *AmpliTAQ Gold* DNA Polimerase 5U/µL (Applied Biosystems/USA) e Água Milli-Q / ultrapura até o volume de 50 µL. Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 95ºC por 10min, 10 ciclos de 94ºC por 15s, 55ºC por 15s e 72ºC por 30s, 20 ciclos de 89ºC por 15s, 55ºC por 15s e 72ºC por 30s, seguida de 72ºC por 20min e 10ºC por 30min.

Para realização da análise de fragmentos, utilizou-se 1 µL de produto de PCR, 0,75 µL GeneScan™ 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) e 8,25 µL Hi-Di ™ Formamide (Applied Biosystems/ USA) para um volume final de 10 µL e as amostras foram submetidas, em seguida, a eletroforese capilar em 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/ USA) utilizando o protocolo padrão e finalmente analisadas com Gene Mapper® ID V3.2 software (Biosystems/ USA).

3.5.6 Sequenciamento genético de nova geração (NGS)

O preparo das bibliotecas de DNA, sequenciamento e análise de bioinformática foram realizados em parceria com o grupo do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT), LIM56.

Foram utilizados os reagentes do kit Nextera XT (fragmentação enzimática) (Illumina, EUA) no preparo das bibliotecas, com 1ng de DNA. Os amplicons gerados foram tratados com a enzima FUPa para os iniciadores serem parciamente digeridos, e em seguida os adaptadores P1 e A juntamente com barcodes foram ligados pela enzima Ligase aos amplicons, que depois foram purificados por beads magnéticas (AgencourtAMPure XP – BackmanCoulter). Para os painéis de 8 genes estudados (*MPL*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH1*, *EZH2*, *U2AF1*, *SF3B1*), as sondas foram projetadas usando o DesignStudio (http://designstudio.illumina.com/) e o comprimento do amplicon terá em média 342 pares de bases. Um total de 238 amplicons foram sequenciados com o tamanho total do alvo de 20443bp e cobertura de 20216bp com uma cobertura horizontal de 98.3%.

O ensaio de sequenciamento do painel personalizado AmpliSeq foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Illumina, Inc., San Diego, CA). Todas as amostras de DNA foram para a mesma concentração inicial (20 ng/µL). Para aumentar artificialmente a diversidade genética, 5% de DNA do fago PhiX foram adicionados à biblioteca de DNA genômico antes de serem carregados na célula de fluxo.

A normalização da amostra foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante Illumina para obter uma concentração de 10 nM por amostra. A Biblioteca Ampliada em Pool (PAL) foi preparada de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, 6 µL de PAL foram diluídos em 600 µL de DAL (Diluted Amplicon Library) e, consequentemente, carregados na célula de fluxo. As execuções foram realizadas no sequenciador Illumina MiSeq com célula de fluxo V2.

3.5.7 Cariótipo

Foram realizados cultivos celulares ($20x10^6$ leucócitos para 9 mL de meio de cultura RPMI) de 24 e 72 horas sem e com agentes estimulantes (12-miristato 13-acetato TPA) e após procedimento padrão de coleta, as lâminas foram pela técnica de Bandamento GTW. A captura das imagens foi realizada por meio de microscópio óptico (Olympkus BX60) acoplado em uma câmera que permite a

captura e digitalização da imagem em software apropriado para cariotipagem (*Applied Spectral Imaging*), com análise de 20 metáfases. A definição de clone e o laudo foram definidos pela nomenclatura internacional ISCN.(60, 61)

3.5.8 Cálculo dos escores prognósticos

Os escores prognósticos foram calculados utilizando-se os dados clínicos informados pelos investigadores nas CRFs dos pacientes, os dados moleculares conforme o resultado obtido pelo Laboratório de Biologia Tumoral do HC-USP, e dos dados de cariótipo de sangue periférico segundo os resultados liberados pelo Laboratório *In Situs* de São Paulo.

Para os escores que necessitavam o cariótipo (DIPSS *plus*, MIPSS70 *plus*, MIPSS70 *plus* 2.0 e GIPSS), foi utilizado o cariótipo disponível (CMO ou CSP), quando apenas um deles estava disponível, independente da origem do material. Quando ambos estavam disponíveis, porém discordantes em quantidade de alterações, foi utilizado o que apresentava mais alterações. Naqueles onde a discordância envolvia não a quantidade, mas qualidade das alterações, foi priorizado o CMO.

3.6 Análise estatística

As variáveis contínuas foram descritas como média e intervalo interquartil e diferenças entre coortes foram avaliadas usando o teste de soma de qualificação Wilcoxon. Diferenças em variáveis categóricas entre coortes foram avaliadas usando teste de Fisher ou teste de qui quadrado, quando apropriado.

A sobrevida global foi calculada como a diferença em meses entre o diagnóstico e a data do último seguimento. As medidas de sobrevida e curvas foram estimadas usando-se o teste de Kaplan-Meier e as comparações agrupadas com o teste de *log-rank*.

A significância estatística foi ajustada para um valor de $p < 05$. Todas as modelagens e análises estatísticas foram realizadas por R versão 3.6.1 (projeto CRAN, www.r-project.org).

3.7 Procedimentos éticos

O estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsinque e a Resolução 196 brasileira.(61, 62)

O protocolo, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e outras informações foram enviados aos comitês de ética (CEPs) de todas as instituições que participaram do estudo, e teve início após avaliação e aprovação deste protocolo por estes comitês. Os pacientes não foram identificados individualmente, apenas iniciais do nome e número de recrutamento, assim como os dados fornecidos pelos investigadores. Não houve nenhuma emenda ao estudo durante o decorrer desta pesquisa. A aprovação do CEP do centro coordenador está identificada na Plataforma Brasil (https://plataformabrasil.saude.gov.br), CAAE: 38706414.8.1001.5073.

Ao assinar o protocolo o investigador concordou em cumprir as instruções descritas e as Boas Práticas de Farmacoepidemiologia (GPP), a Declaração de Helsinque, e outros requisitos regulatórios aplicáveis, assim como todos os requisitos legais locais.(61)

3.8 Gerenciamento de dados

3.8.1 Ficha clínica (CRF)

Apenas a equipe participante de cada centro de pesquisa participante teve acesso à Ficha Clínica (CRF). Todos os dados coletados para os fins deste estudo foram registados usando uma CRF em papel, e posteriormente inseridos no bano de dados REDCap (https://www.project-redcap.org/).

O investigador principal teve acesso aos dados obtidos ao longo do estudo. Os dados estão disponíveis para cada centro de estudo que realizou sua coleta e será arquivado em papel e no REDCap de acordo com os termos das leis locais (por 5 anos).

3.9 Emendas ao protocolo e outras alterações

Quaisquer alterações ao protocolo puderam ser feitas na forma de uma emenda, mas nenhuma foi necessária. Se houvesse áreas de interesse investigadas para investigadores participantes que não fossem abordadas no plano geral descrito neste protocolo, seleções de dados adicionais poderiam ser implementadas após consulta com o investigador coordenador, e com a anuência do grupo.

Quaisquer emendas a este estudo, que não fossem administrativas deveriam ser aprovadas pelo CEP de cada centro.

3.10 Outros procedimentos do estudo

3.10.1 Procedimentos de monitoramento

Não foi necessário nem realizado monitoramento neste estudo.

3.10.2 Registo de dados e retenção de documentos

Os investigadores preencheram a ficha clínica, que foi enviada ao primeiro autor para gerenciamento de dados. A coleta de dados de paciente na ficha clínica durante o estudo foi documentada de forma anônima, e os pacientes foram identificados apenas por um número de indivíduo e centro e suas iniciais. Os investigadores mantiveram os documentos fonte de cada paciente no estudo, que consistem em todas as informações médicas e demográficas, incluindo dados de laboratório, relatórios de exames, etc., e mantiveram uma cópia do consentimento do paciente para coleta de dados. Todas as informações do banco de dados são ligadas a estes documentos fonte no arquivo do paciente.

Os documentos essenciais listados abaixo serão mantidos pelo investigador pelo tempo exigido para conformidade com as regulamentações nacionais. Os investigadores concordaram em aceitar os procedimentos para retenção de documentos ao assinar o protocolo. Os documentos essenciais incluem:

1. Aprovações do protocolo do estudo e de todas as emendas pelo CEP
2. Todos os documentos fonte e registos laboratoriais
3. Conteúdos do banco de dados
4. Consentimento do paciente para coleta de dados
5. Qualquer outro documento relacionado ao estudo

3.10.3 Divulgação e confidencialidade

Ao assinar o protocolo, o investigador concordou em manter todas as informações relacionadas ao protocolo como estritamente confidenciais e exigir confidencialidade semelhante de sua equipe e do CEP. Os documentos do estudo estão salvaguardados de maneira apropriada a fim de assegurar sua confidencialidade.

3.10.4 Descontinuação do estudo

A participação neste estudo foi voluntária. Os indivíduos de pesquisa puderam retirar seu consentimento livre e esclarecido a qualquer momento. O investigador pôde interromper a participação de qualquer indivíduo de pesquisa neste estudo a qualquer momento caso achasse apropriado e do melhor interesse para o indivíduo de pesquisa.

O grupo coordenador pôde descontinuar o estudo a qualquer momento caso fosse descoberta qualquer coisa que pudesse afetar a segurança dos indivíduos de pesquisa, ou em caso de uso indevido dos dados coletados.

3.10.5 Patrocínio e financiamento do Estudo

O estudo foi financiado pela NOVARTIS Biociências SA, pelo Centro de Estudos do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFG, e por recursos próprios dos investigadores.

Os custos de levantamento de dados e preenchimento de fichas e CRFs foram arcados pelos próprios pesquisadores.

A Novartis Biociências S.A. contribuiu com U$ 145.750,00, através de ajuda parcial de custo. Esse valor foi destinado apenas a tornar viável parte dos aspetos do estudo que, de outra forma, não seriam viáveis.

O investigador-patrocinador e a instituição foram responsáveis pela administração e uso dos recursos financeiros para arcar com os gastos decorrentes deste estudo. A Novartis Biociências S.A. não teve qualquer participação na preparação, logística, coleta, armazenamento e acesso aos dados, avaliação estatística, interpretação de resultados e redação do manuscrito para publicação. Não há qualquer tipo de restrição ou controle externo por parte da Novartis Biociências S.A.

O Investigador-Patrocinador e a instituição investigadora foram responsáveis pelas questões de seguro.

3.11 Política de divulgação

O Investigador-Patrocinador será responsável pelo relato dos resultados do estudo dentro de um período de 24 meses após a entrada da última visita de paciente e preparação do manuscrito.

3.12 Propriedade dados e autoria da publicação

Todos os dados coletados ao longo do estudo foram analisados centralmente pelo investigador principal do estudo e o grupo coordenador. Os resultados serão divulgados após a análise global de todos os centros de estudo em publicações nacionais ou internacionais sob a responsabilidade dos investigadores. Para publicação, o investigador principal do estudo aceita a responsabilidade pela redação e supervisão de resumos ou manuscritos originados do banco de dados. Minutas de resumos, manuscritos, ou outros meios de publicação científica devem ser enviados para avaliação e aprovação por todos os investigadores envolvidos.

A autoria será definida pela diretriz do Comitê Internacional de Editores de Periódicos Médicos.(63)

Diversas publicações secundárias podem ter origem a partir do banco de dados e subprojectos ou análises de dados por região podem ser gerados, mediante pedido para uso de dados e envio de subprojecto ao grupo coordenador. A autoria do subprojecto respeitará a importância da contribuição de cada investigador por sub-região para ser especificamente considerada, a fim de incluir investigadores que trabalham em regiões do Brasil com um menor número de pacientes, mas contribuem para trazer novas informações para o mapeamento regional da doença.

4. RESULTADOS

4.1 População estudada

Entre fevereiro de 2016 a dezembro de 2019, foram recrutados 241 pacientes com o diagnóstico de MFP, MF-PV ou MF-TE. Após revisão diagnóstica e reclassificação, 11 foram excluídos. Destes, dois se tratavam de pacientes com LMC com fibrose medular secundária e previamente com cariótipo normal e *BCR-ABL1* negativos, mas que se mostraram positivos após nossa análise. Um apresentava apenas mutação *JAK2 V617F* positiva, mas não tinha outras anormalidades hematológicas. Quatro foram reclassificados como síndrome mieloproliferativa não-classificada, um se tratava de uma hemoglobinopatia CC, um reclassificado como PV, um como policitemia idiopática, e um diagnosticado como síndrome mielodisplásica (SMD) com fibrose medular.(12) Assim, 230 casos foram incluídos para análise, onde 85 eram do HC-UFG, 33 do H Sta. Marcelina, 8 do HC-USP, 47 na HC-UFMG, 8 do HEMOMED, 14 da Sta. Casa SP, 27 da UNICAMP e 8 do HC-UFPR, sendo portanto 36,9% oriundos da região centro-oeste, 59,7% da região sudeste e 3,4% da região sul.

4.2 Dados clínicos

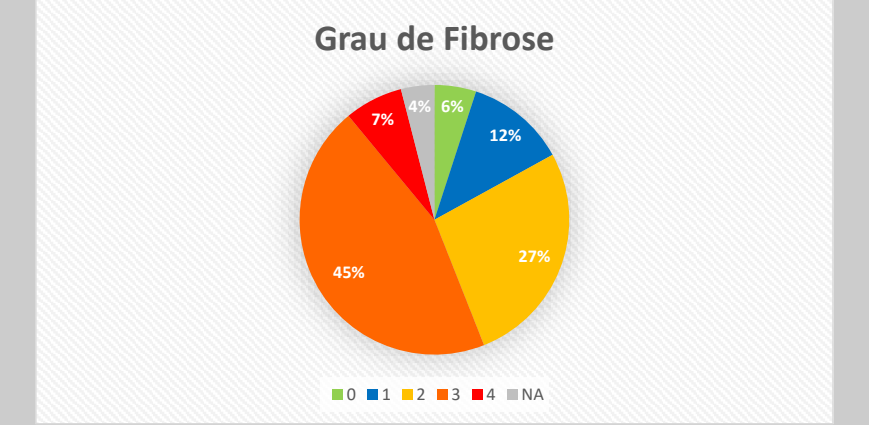
A idade média de idade dos pacientes analisados foi de 65 anos, variando entre 24 e 89 anos, amplitude interquartil de 55 a 72 anos, desvio padrão de 13.7. Em relação ao sexo, 127 (55,2%) eram do sexo masculino e 103 (44,7%) do sexo feminino.

Em relação aos índices hemateméticos, o nível de hemoglobina médio foi de 10,9 g/dL, variando de 4,3 a 17,9 g/dL, amplitude interquartil de 9,2 a 12,8 g/dL, desvio-padrão de 2,63. A contagem leucocitária média foi de 14,2 x 10^9/L, variando de 1,3 a 141,0 x 10^9/L, amplitude interquartil de 5,2 a 13,9 x 10^9/L /L, desvio-padrão de 18,16 A contagem plaquetária média foi de 355 x 10^9/L, variando de 11 a 2040 x 10^9/L, amplitude interquartil de 147 a 463, desvio-padrão de 300,6.

O tamanho médio do baço foi de 5 cm, variando de 0 a 25 cm, amplitude interquartil de 0 a 12 cm, desvio-padrão de 7,6.

Quanto ao grau de fibrose medular, 12 (6%) pacientes não apresentavam fibrose, 28 (12%) apresentavam grau 1, 63 (27%) grau 2, 103 (45%) grau 3, e 15 (7%) grau 4. Em 9 (4%) o grau de fibrose não foi especificado, como mostrado no gráfico 1.

Gráfico 1 – Grau de fibrose medula óssea em 221 pacientes com MF



Dos pacientes estudados, 28 (12,2%) não realizaram pesquisa da mutação *JAK2* V617F antes do estudo. Do total dos que pesquisaram, 121 (59,9%) foram *JAK2* V617F positivos e 81 (40,1%) foram negativos.

Em relação á necessida transfusional, 37 (16%) eram dependentes de transfusão e 191 (84%) não eram no momento de sua avaliação. Em 1 caso não foi possível definir esse critério com certeza.

Em relação ao seu tratamento, 175 (76%) utilizaram hidroxiurea como tratamento, 54 (24%) nunca usaram, e em 1 caso não foi possível se obter essa informação com certeza. Em relação ao ruxolitinibe, 38 (16%) usaram e estavam em uso da medicação, 191 (84%) nunca utilizaram, e em 1 caso não foi possível se obter essa informação com certeza. Os dados demográficos estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos dos 230 pacientes com MF

Parâmetro	Média	Intervalo (a)	AI (a)	DP
Idade (anos)	65	24 - 89	55 - 72	13,7
Sexo masculino (%)	127 (55,2)	-	-	-
Hb (g/dL)	10,9	4,3 – 17,9	9,2 – 12,8	2,63
Leucócitos (x 10^9/L)	14,2	1,3 – 141	5,2 – 13,9	1,8163
Plaquetas (x 10^9/L)	355	11 – 2.040	147 – 463	300,6
Baço (cm)	5	0 - 25	0 - 12	7,6
Grau de Fibrose n (/%)				
Grau 0	12 (6)			
Grau 1	28(12)			
Grau 2	63 (27)			
Grau 3	103 (45)			
Grau 4	15 (7)			
ND	9 (4)			
***JAK2* V617F prévia n (%)**	202 (87,4)			
Positiva	121 (59,9)			
Negativa	81 (40,1)			
Dep Transfusão n (%)	37 (16)			
Uso hidroxiurea n (%)	175 (76)			
Uso ruxolitinibe n (%)	38 (16)			

AI: (amplitude interquartil); DP (Desvio padrão); ND (não disponível); Dep (dependente)

4.3 Resultados mutacionais

Foram pesquisadas as mutações *JAK2 V617F* pela técnica de ARMS, *CALR1* e *CALR2* através da técnica de análise de fragmentos, e as mutações *MPL*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*, *SRSF2* e *U2AF1* por NGS, conforme descrito.

Dos 189 (82,2%) pacientes estudados para a mutação *JAK2* V617F, 103 (54,5%) foram positivos, e 86 (45,5%) negativos. Para as mutações na região *CALR*, 187 (81,3) amostras foram estudadas, sendo 55 (29,4%) positivas. Em 4 (2,1%) dos 186 (80,7%) pacientes estudados para as três as mutações diretora, foi encontrada a mutação *MPL*. Em 186 (80.9%) dos pacientes pudemos estudar as mutações somáticas *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*, *SRSF2* e *U2AF*1. Esses resultados estão nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Frequência mutacional em 230 pacientes com MF

Mutação	Mutado n (%)	Não Mutado n (%)	Indisponível n (%)
***JAK2* V617F**	103 (44,8)	86 (37,3)	41 (17,7)
CALR1	42 (18,2)	132 (57,3)	43 (18,6)
CALR2	13 (5,6)		
MPL	4 (1,7)	182 (79,1)	44 (19,1)
TN	27 (11,7)	169 (69,1)	44 (19,1)
ASXL1	63 (27,3)	122 (53)	45 (19,5)
SRSF2	4 (1,7)	182 (78,7)	45 (19,5)
EZH2	34 (14,7)	151 (65,6)	45 (19,5)
IDH1	17 (7,3)	168 (73)	45 (19,5)
IDH2	7 (3)	178 (77,3)	45 (19,5)
U2AF1	2 (0,8)	183 (79,5)	45 (19,5)

Tabela 3 – Quantidade de mutações por paciente

Mutações por paciente	Total	Percentual (%)
0	**58**	**25,2**
1	**82**	**35,6**
2	**67**	**29,1**
3	**18**	**7,8**
4	**3**	**1,3**
5	**2**	**0,8**

Em 27 (11,7%) pacientes não foi identificada nenhuma mutação diretora, e após nova revisão diagnóstica confirmatória foram categorizados como TNs. Essa população se mostrou estatisticamente mais dependente de transfusão e com uma contagem plaquetária maior. Eles também apresentaram diferenças estatísticas na sobrevida, demonstrada mais adiante Os principais achados deste grupo encontram-se nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Dados demográficos dos pacientes triplo-negativos

Variável	Sim n (DP)	Não n (DP)	*p*
Idade (anos)	59.6 (+/- 3)	63.8 (+/- 1)	0,2
Cont. Leucócitos (x 10^9/L)	23.405 (+/-5.673)	12.233 (+/- 1.035)	0,06
Cont. Plaquetas (x 10^9/L)	379,7 (+/- 40,3)	228,9 (+/- 25,2)	0,002
Baço (cm)	7.2 (+/- 1,4)	6.9 (+/- 0,6)	0,82

Tabela 5 – Características dos pacientes triplo-negativos

Variável	Sim n (%)	Não n (%)	*p*
ASXL1			
Mutado	8 (30%)	55 (35%)	0,78
Não-Mutado	19 (27%)	102 (65%)	
EZH2			
Mutado	4 (14%)	30 (19%)	0,73
Não-Mutado	23 (86%)	127 (81%)	
IDH1			
Mutado	2 (7.5%)	14 (9%)	0,73
Não-Mutado	25 (92.5%)	143 (91%)	
IDH2			
Mutado	0	7 (4.5%)	-
Não-Mutado	27	150 (95.5%)	
SRSF2			
Mutado	4 (2%)	3 (11%)	0.06
Não-Mutado	153 (98%)	24 (89%)	
U2AF1			
Mutado	0	2	-
Não-Mutado	27	155	
CMO			
Normal	13 (65%)	85 (70%)	0,81
Anormal	4 (20%)	18 (15%)	
Sem Metáfases	3 (15%)	19 (15%)	
CSP			
Normal	13 (48%)	61 (40%)	0,62
Anormal	5 (18.5%)	26 (17%)	
Sem Metáfases	9 (33.5%)	65 (43%)	
Necessidade transfusional			
Sim	10 (37%)	20 (12.5%)	0,003
Não	17 (63%)	139 (87.5%)	

CMO (cariótipo de medula óssea), CSP (cariótipo sangue periférico)

4.4 Resultados de CMO e CSP:

Na população de 230 pacientes estudados, 176 (76,5%) realizaram CMO. Em 149 casos houve crescimento de metáfases para análise, correspondendo a 64,8% da população total e 84,6% dos que colheram.

Quanto ao CSP, em 217 (94,3%) casos foi enviada amostra para realização do exame. Em 124 casos houve crescimento celular, correspondendo a 53,9% da população total e 57,1% dos que colheram.

Em relação a taxa de insucesso de crescimento do CMO e do CSP, foram avaliados possíveis fatores de risco associados como idade, grau de fibrose e contagem leucocitária, sendo que o crescimento do CSP teve associação estatisticamente significativa com maior grau de fibrose e contagem leucocitária elevada, como demonstrado nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Taxa de crescimento de cariótipos de medula óssea e fatores de risco estudados

	Total		
Variável	**Sem metaphases**	**Com metaphases**	***p***
Idade (mediana)			
> 65 anos	19 (20%)	76 (20%)	0.09
< 65 anos	8 (10%)	73 (90%)	
Grau de fibrose			
0 - 2	11 (14%)	68 (86%)	0.83
3 - 4	14 (15.5%)	76 (84.5%)	
Leucócitos (mediana:)			
> 14,2 x 10^9/dL	10 (11%)	79 (89%)	0.2
< 14,2 x 10^9/dL	16 (18.6%)	70 (83.4%)	

Tabela 7 – Taxa de crescimento de cariótipos de sangue periférico e fatores de risco estudados

	Total		
	Sem metaphases	**Com metaphases**	***p***
Variável	**n (%)**	**n (%)**	
Idade (mediana)			
> 65 anos	53 (43)	68 (57)	0.78
< 65 anos	39 (41)	56 (59)	
Grau de fibrose			
0 - 2	52 (53,6)	45 (46,4)	0.002
3 - 4	35 (31,5)	76 (68,5)	
Leucócitos (mediana)			
> 14,2 x 10^9/dL	37 (34)	71 (66)	0.01
< 14,2 x 10^9/dL	54 (51)	52 (49)	

Nos 54 (23,5%) do total de pacientes que não coletaram CMO, em 30 casos obteve-se metáfases com CSP. Em 27 dos casos que coletaram CMO, não houve crescimento; destes, em 11 houve crescimento do CSP. Assim, num total de 81 pacientes onde não se obteve um resultado de CMO, pôde-se obtê-lo com o CSP em 41 (50,6%) deles.

Ainda, de um total de 230 pacientes, adicionando-se os resultados conseguidos com CSP aos obtidos com CMO, elevou-se o total de resultados de cariótipo para análise de 149 (64,8%) para 190 (82,6%) em 230 pacientes.

Em 43 casos foram encontradas alterações de CMO e/ou CSP. As alterações encontradas estão na tabela 8.

Tabela 8 – Descrição das alterações de cariótipos encontradas

	Cariótipo Medula Óssea (CMO)	Cariótipo Sangue Periférico (CSP)
1	não realizado	46,XY,del(20)(q11.2)[7]/46,XY[13]
2	Não realizado	45,X,-Y[4],46,XY[3]
3	47,XY,+der(1)del(1)(q32)[10]/ 48,XY,+8,+9[10]	47~48,XY,+der(1)del(1)(p32),7,+8,+9[20]
4	45,X;-Y,del(13)(q14q22)[5]/45,X,-Y[15]	45,X,-Y[23]/46,XY[1]
5	46,XY,del(20)(q12)[6]/46,XY[1]	46,XY,del(20)(q12)[6]/46,XY[1]
6	46,XY,del(5)(q33q35)[8]/46,XY[12]	46,XY,del(5)(q31)[21]/46,XY[9]
7	92,XXXX[5]/46,XX[25]	46,XX[22]
8	46,X;-Y,del(13)(q14.q22)[5]/45,X;-Y [15]	45,X,-Y [23] / 46,XY [1]
9	48,XY,+8[3]/48,XY,+9[16],46,XY[1]	48,XY,+8,+9[26]
10	46,XX[20]	47,XX,+9[14]/46,XX[7]
11	não realizado	45,X,-Y[11]
12	46,XY,add(8)(p23)[20]	não realizado
13	47,XYqL+c,+8,del(15)(q11.2q14)[14]/ 48,XYqL+c idem,+9[2]/46,XYqL+c[16]	47,XYqh+,+8,del(15)(q11.2q14)[8]/ 46,XYqh+[2]
14	46,XY[20]	47,XX,+21[18]/46,XX[2]
15	não realizado	47,XX,+der(1)del(1)(p36.1)[8]/46,XX[5]
16	46,XX,t(10;13)(p11.2;q12)or(p10;p10)[19]/46,XX[1]	46,XX,add(7)(p22),-10,+21[5]
17	46,XX,t(1;14)(p34;q24)[8]/ 47XX,t(1;14)(p34;q24),+8[2]/46,XX[3]	46,XX,t(1;14)(p36;q24)[2]/ 46,XX,idem,add(7)(p22)[3]/ 47,XX,t(1;1714)(p36;q24)+8[9]/ 47,XX,t(1;14)p36;q24),add(7)(p22),+8[4]
18	46,XX[20]	46,XX,t(6;13)(p23;q14)[15]
19	46,XY,der(16)t(1;16)(q21;p13.3)[16] / 46,XY [4]	46,XY,add(16)(p13.3)[17]/46,XY[3]
20	não realizado	46,XY,inv(14)(q22q32)[5]
21	46,XY,inv(12)(q13-3q 24-31)	sem crescimento
22	46,XX,t(10;12)(p 11.2;q13)[20]	46,XX,t(9;12)(q22;p13)[20]
23	não realizado	46,XY,del(20)(q13.1)[7]/46,XY[24]
24	sem crescimento	47,XX,+8(8)/48,XX,+8,+21[2]/ 49,XX,+8,+21+21[2]
25	46,XY[20]	46,XY,-7,+mar[3]/46,XY[24]
26	não realizado	46,XY,t(3;12)(q25;q14)[20]
27	46,XY[7[	46,XY,del(20)(q11.2)[16]/46,XY[4]
28	47,XY,+mar[21]	47,XY,+8,add(9)(q34)[20]
29	46,XY,del(13)(q12q14)[20]	46,XY[12]
30	47,XX,+9[7]/46,XX[2]	sem crescimento
31	47,XY,+der(?)t(1;?)(q11;?)[10]	sem crescimento
32	46,XY[20]	46,XX,add(18)(p11.3)[11]

Tabela 8– Descrição das alterações de cariótipos encontradas (cont.)

33	46,XY,t(10;11)(q22;p15)[20]	46,XY,t(8;11)(q21;p15)[20]
34	47,XX,+9[4]/46,XX[7]	47,XX,+9[2]/46,XX[4]
35	sem crescimento	47,XY,+9[1]/46,XY[1]
36	48,XX,+8,+9 [20]	sem crescimento
37	47,XX,+8[16] 46,XX[4]	47,XX,+8 [16]/46,XX[4]
38	46,XX,t(5:12)(q31;p13)[20]	46 XX, t(5;12)(q33;p13) [20]
39	45,XX,-7[13]/47,XX,+8[7]	47,XX,+8[7]
40	46,XX,ins(2;6)(q13;p12p22),del (2)(q13;q23)[20]	46,XX,del(6)(p21.3)[8]
41	46,XX,add(1)(p16.3),der(4)t(1:4)(q21; q31)/46 XX [5]	46,XX,add(1)(p.36.3),add(4)(q35)[13]/ 46,XX,idem,add(6)(p25)[5]/46,XX[2]
42	46,XX,del(13)(q13q14)[20]	46,XX,del(13)(q13q14)[20]
43	não realizado	46,XY,del(11)(q14)[3]/46,XY[1]

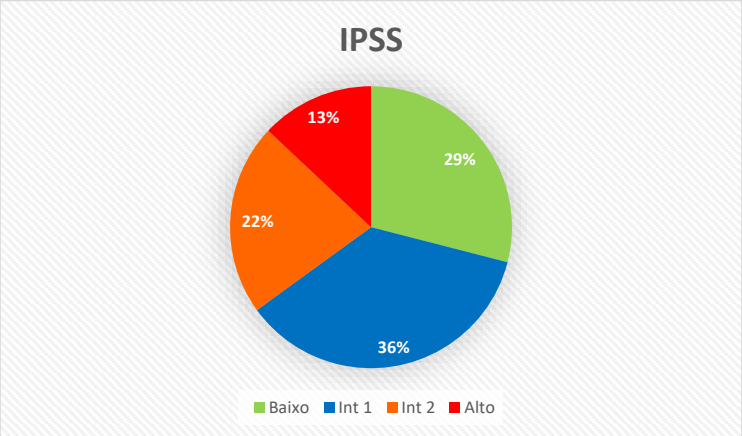
A realização de CSP influenciou a classificação pelos escores prognósticos dependentes de cariótipo em 8 casos, onde 4 o CMO não estava disponível (casos 20, 24, 26 e 43), e em 4 estavam normais (casos 14, 18, 25, 32). Em um caso (caso 28) o CSP influenciou a classificação em todos os escores de risco dependentes de cariótipo (DIPSS *plus*, MIPSS70 *plus*, MIPSS70 *plus* 2.0 e GIPSS), enquanto o CMO não influenciou o DIPSS *plus*. Em um caso (caso 7) encontrada alteração significativa no CMO que não foi vista no CSP, com influência nos escores MIPSS70 *plus*, MIPSS70 *plus* 2.0 e GIPSS.

4.5 Aplicação dos escores prognósticos

Utilizando-se os dados da CRF e os obtidos após análise molecular e de cariótipo foram calculados, os escores IPSS, DIPSS, DIPSS *plus*, MIPSS70, MIPSS70 *plus*, MIPSS70 *plus* 2 e GIPSS em todos os casos quando possível, e o MYSEC-PM exclusivamente nos casos de MF-PV e MF-TE.

O IPSS foi calculado para 229 pacientes, sendo que 66 (29%) apresentavam IPSS de baixo risco, 84 (36%) grau intermediário 1, 50 (22%) grau intermediário 2, e 29 (13%) alto grau. A distribuição dos IPSS obtidos está no gráfico 2:

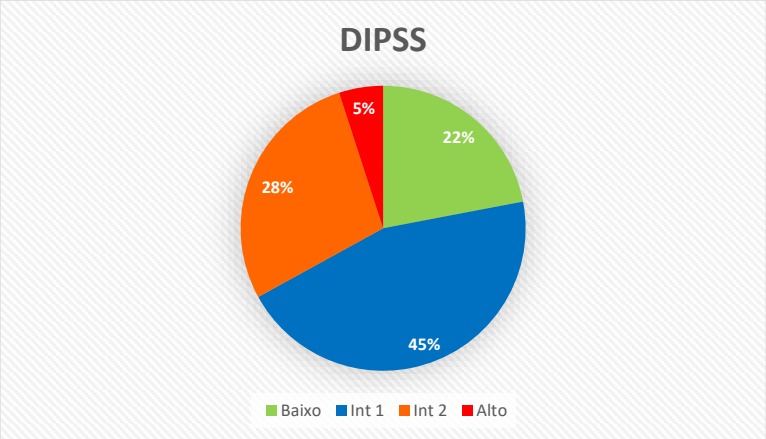
Gráfico 2 – IPSS em 229 pacientes com MF



IPSS (escore prognóstico internacional); Int-1 (intermediário 1), Int-2 (intermediário 2)

O DIPSS foi aplicado a 229 casos, sendo que 50 (22%) apresentavam DIPSS baixo risco, 105 (45%) grau intermediário 1, 64 (28%) grau intermediário 2, e 11 (05%) alto grau. A distribuição dos DIPSS obtidos está no gráfico 2:

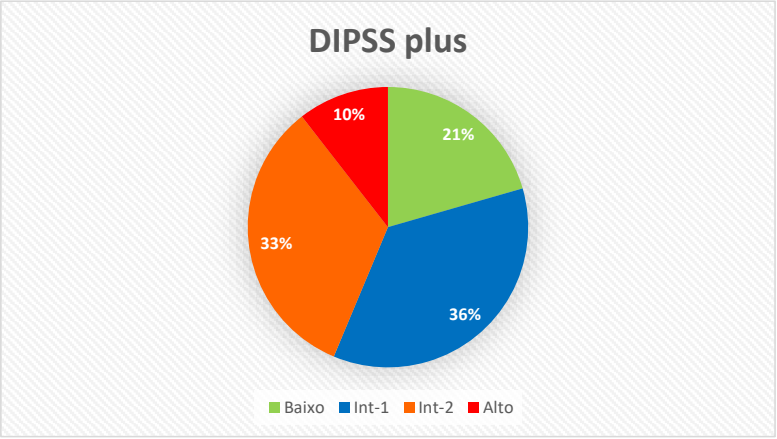
Gráfico 3 - DIPSS em 229 pacientes com MF



DIPSS (escore prognóstico internacional dinâmico); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2)

Foi possível calcular o DIPSS *plus*, em 190 (82,6%) dos casos. Destes, 39 (20,5%) apresentaram DIPSS *plus* de baixo risco, 68 (35,7%) grau intermediário 1, 63 (33,1%) grau intermediário 2, e 20 (10,5%) alto grau. Em 41 (17,7%) casos não foi possível calcular o DIPSS. A distribuição dos escores DIPSS *plus* obtidos está mostrada no gráfico 4:

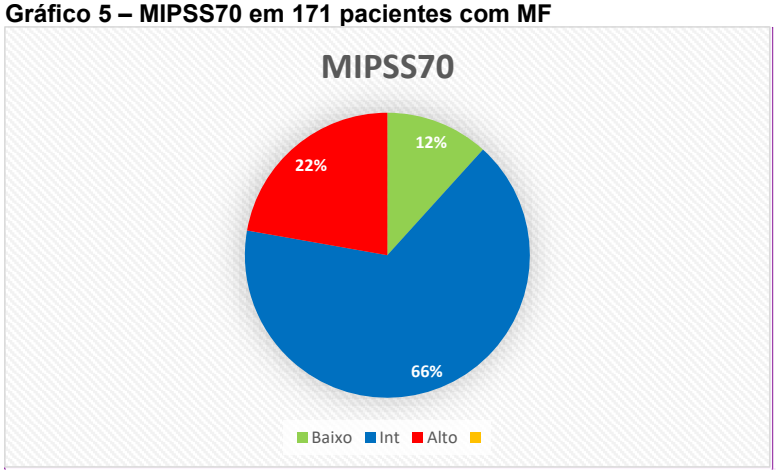
Gráfico 4 – DIPSS *plus* em 190 pacientes com MF



DIPSS *plus* (escore prognóstico internacional dinâmico revisado); Int-1 (intermediário 1) Int-2 (intermediário 2)

Em 171 (74%) casos pudemos calcular o MIPSS70. Destes, 20 (11,7%) apresentavam MIPSS70 de baixo risco, 113 (66%) grau intermediário e 38 (22,2%) alto grau. Em 60 (26%) casos não foi possível calcular o MIPSS70. Os escores obtidos estão plotados no gráfico 5.

Gráfico 5 – MIPSS70 em 171 pacientes com MF

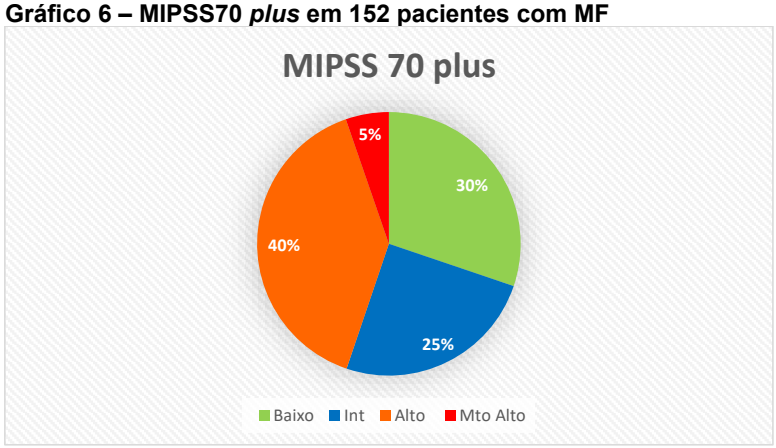


MIPSS70 (escore prognóstico internacional mutacional); Int (intermediário)

Comentado [IB8]: Corrigir no gráfico para Alto.

O MIPSS70 *plus* foi calculado em 152 (65,8%) dos pacientes. Destes, 46 (30,2%) foram de baixo risco, 38 (25%) foram de risco intermediário, 60 (39,5%) de alto grau e 08 (5,3%) de muito alto grau. Em 79 (34,2%) do total de casos não foi possível calcular o MIPSS70 *plus*. Esses resultados estão no gráfico 6.

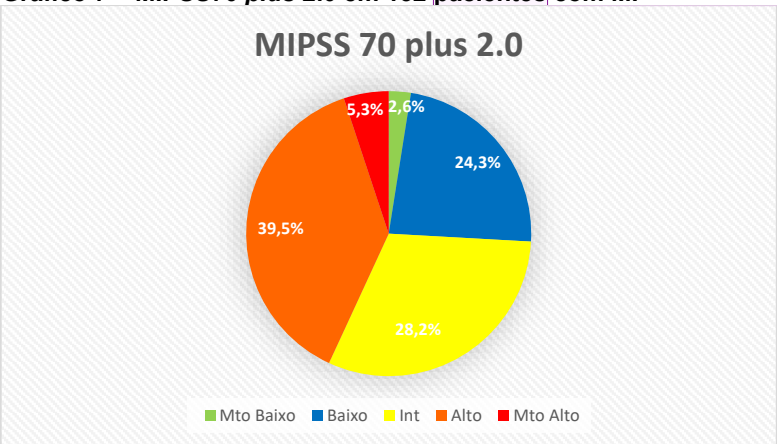
Gráfico 6 – MIPSS70 *plus* em 152 pacientes com MF



MIPSS70 *plus* (escore prognóstico internacional mutacional revisado); Int (intermediário)
Mto Alto (muito alto)

O MIPSS70 *plus* 2.0 foi calculado em 152 (65,8%) dos pacientes. Destes, 4 (2,6%) foram de muito baixo risco, 37 (24,3%) foram de baixo risco, 43 (28,2%) foram de risco intermediário, 60 (39,5%) de alto risco e 8 (5,3%) de muito alto risco. Em 79 (34,2%) do total de casos não foi possível calculá-lo. Essa distribuição dos escores calculados se encontra no gráfico 7:

Gráfico 7 – MIPSS70 *plus* 2.0 em 152 pacientes com MF

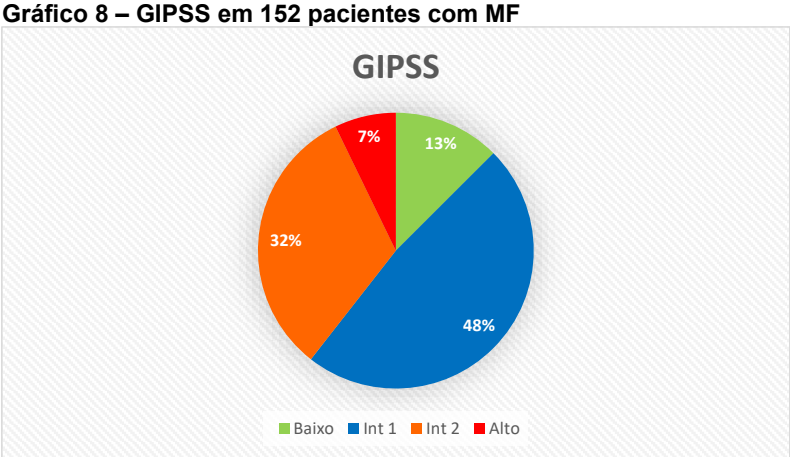


MIPSS70 *plus* 2.0 (escore prognóstico internacional mutacional revisado versão 2.0); Int (intermediário); Mto baixo (muito baixo); Mto Alto (muito alto)

Comentado [IB9]: Fpacientesaltou as porcentagens na pizza.

Calculamos o GIPSS em 152 (65,8%) dos pacientes. Destes, 19 (12,5%) foram de baixo risco, 73 (48%) foram de risco intermediário 1, 49 (32,2%) foram de risco intermediário 2, e 11 (7,2%) de alto risco. Em 79 (34,2%) do total de casos não foi possível calculá-lo. Estes escores obtidos estão no gráfico 8

Gráfico 8 – GIPSS em 152 pacientes com MF

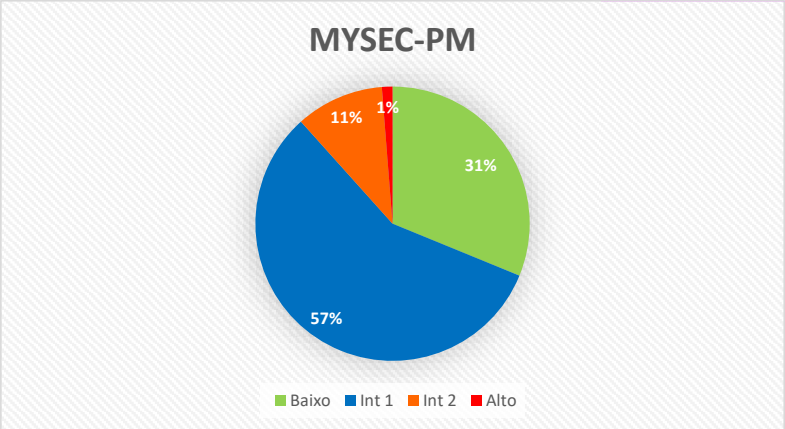


GIPSS (escore prognóstico por dados genéticos); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2)

Um total de 20 (8,6%) casos eram de MF-PV e MF-TE, sendo, 10 (50%) de cada tipo. Em relação ao escore MYSEC-PM, 6 (30%) foram de baixo risco, 10 (50%) foram de risco intermediário 1, 3 (15%) intermediário 2, e 1 (5%) de alto risco. Essa distribuição de risco está no gráfico 9:

Gráfico 9 – MYSEC-PM em 20 casos de MF-PV e MF-TE

Comentado [IB10]: Faltou as porcentagens na pizza



MYSEC-PM (escore prognóstico para mielofibrose secundária a policitemia vera e trombocitemia essencial); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2)

A distribuição dos escores prognósticos está resumida na tabela 9:

Tabela 9 – Distribuição dos vários escores prognósticos estudados entre os 230 pacientes com MF

Escore	n.	Mt Baixo (%)	Baixo (%)	Int (%)		Alto (%)	Mt Alto (%)	NA/D n%
				Int-1 (%)	Int-2 (%)			
IPSS	229	-	29	36	22	13	-	4
DIPSS	229	-	22	45	28	05	-	4
DIPSS *plus*	190	-	20,5	35,7	33,1	10,5	-	17,7
MIPSS70	171	-	11,7	66		22,2	-	26
MIPSS70 *plus*	152	-	30,2	25		39,5	5,3	34,2
MIPSS70 *plus* 2.0	152	2,6	24,3	28,2		39,5	5,3	
GIPSS	152	-	12,5	48	32,3	7,2	-	34,2
MYSEC-PM	20	-	30	50	15	5	-	91,3

A percentagem é em relação ao número de pacientes onde foi possível se aplicar o escore

n – número de pacientes onde foi possível aplicar o escore.

NA/D (não avaliado / não disponível); IPSS (escore prognóstico internacional); DIPSS (escore prognóstico internacional dinâmico); DIPSS *plus* (escore prognóstico internacional dinâmico revisado); MIPSS70(escore prognóstico internacional mutacional); MIPSS70 *plus* (escore prognóstico internacional mutacional revisado); MIPSS70 *plus* 2.0(escore prognóstico internacional mutacional revisado versão 2.0); GIPSS (escore prognóstico por dados genéticos); MYSEC-PM (escore prognóstico para mielofibrose secundária a policitemia vera e trombocitemia essencial); Mto baixo (muito baixo); Int (intermediário); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2); Mt Alto (muito alto);

4.6 Comparação entre os escores prognósticos

Comparamos os pacientes com escores disponíveis DIPSS *vs* DIPSS *plus*, MIPSS70 *vs* IPSS, MIPSS70 *plus* vs DIPSS *plus*, MIPSS70 *plus* vs MIPSS70 *plus* 2.0, GIPSS vs DIPSS *plus*, e DIPSS *plus* vs MYSEC-PM.

Em 189 (81%) dos casos comparou-se o DIPSS com o DIPSS *plus*. Nesta comparação, em 153 (80,9%) casos houve concordância entre os grupos de risco. Em 36 (19,0%) houve discordância, sendo que em 31 (16,4%) o DIPSS

plus elevou o grau de risco em relação ao DIPSS; esta situação foi mais evidente em 28 (14,8%) casos que foram classificados como escore intermediário 1 e intermediário 2 pelo DIPSS. Em 5 (2,6%) o grau de risco diminuiu quando se aplicou o DIPSS *plus*, conforme demonstrado na tabela 10:

Tabela 10 – Comparação entre DIPSS *e* DIPSS *plus*

	DIPSS *plus*				
DIPSS	**Baixo**	**Int-1**	**Int-2**	**Alto**	**NA**
Baixo	**38**	**3**	**0**	**0**	**9**
Int 1	**1**	**64**	**16**	**1**	**23**
Int 2	**0**	**1**	**44**	**12**	**7**
Alto	**0**	**0**	**3**	**7**	**1**
NA	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**

DIPSS (escore prognóstico internacional dinâmico); DIPSS *plus* (escore prognóstico internacional dinâmico revisado); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2); NA (não avaliável)

A comparação entre o MIPSS70 e o IPSS foi realizada em 171 (74%) casos. Aqui, em 93 (54,3%) casos houve concordância entre os grupos de risco. Em 78 (45,6%) houve discordância, sendo que em 62 (36,2%) o MIPSS70 elevou o grau de risco em relação ao IPSS, esta discordância mais notada no grau de risco baixo do IPSS, em 40 (23,3%) casos. Em 16 (9,3%) o MIPSS70 diminuiu o grau de risco, como demonstrado na tabela 11.

Tabela 11 – Comparação entre MIPSS70 e IPSS em 171 pacientes com MF

	IPSS				
MIPSS70	**Baixo**	**Int-1**	**Int-2**	**Alto**	**NA**
Baixo	10	10	0	0	0
Int	40	47	20	6	0
Alto	2	6	14	16	0
NA	14	21	16	7	1

IPSS (escore prognóstico internacional); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2); NA (não avaliável)

Foi possível comparar o MIPSS70 *plus* com o DIPSS *plus* em 151 (65,3%) pacientes. Em 73 (48,3%) casos houve concordância entre os grupos de risco. Em 78 (51,6%) houve discordância, sendo que em 33 (21,8%) o MIPSS70 *plus* elevou o grau de risco em relação ao DIPSS *plus*, e em 45 (29,8%) o grau de risco diminuiu, conforme tabela 12.

Tabela 12 – Comparação entre MIPSS70 *plus* e DIPSS *plus* em 151 pacientes com MF

	DIPSS *plus*				
MIPSS70 *plus*	**Baixo**	**Int-1**	**Int-2**	**Alto**	**NA**
Baixo	20	16	10	0	0
Int	10	18	9	0	0
Alto	2	17	31	10	0
Mto alto	0	2	2	4	0
NA	0	0	0	0	40

DIPSS (escore prognóstico internacional dinâmico revisado); MIPSS70 *plus* (escore prognóstico internacional mutacional revisado); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2); Mto Alto (muito alto) NA (não avaliável)

Em 152 (65,8%) pacientes foi comparado o MIPSS70 *plus* com o MIPSS70 *plus* 2.0. Em 139 (91,4%) casos houve concordância entre os grupos de risco. Em 13 (8.5%) houve discordância, sendo que em 7 (4,6%) o MIPSS70

plus 2.0 elevou o grau de risco em relação ao MIPSS70 *plus*, e em 6 (3,9%) o grau de risco diminuiu, conforme tabela 13.

Tabela 13 – Comparação entre MIPSS70 *plus* e MIPSS70 *plus* 2.0 em 152 pacientes com MF

	MIPSS70 *plus* 2.0					
MIPSS70 *plus*	**Mto Baixo**	**Baixo**	**Int**	**Alto**	**Mto Alto**	**NA**
Baixo	**4**	**37**	**5**	**0**	**0**	**0**
Int	**0**	**0**	**38**	**0**	**0**	**0**
Alto	**0**	**0**	**0**	**58**	**2**	**0**
Mto alto	**0**	**0**	**0**	**2**	**6**	**0**
NA	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**78**

MIPSS70 *plus* (escore prognóstico internacional mutacional revisado); MIPSS70 *plus* 2.0 (escore prognóstico internacional mutacional revisado versão 2.0); Int (intermediário); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2); Mt Alto (muito alto); NA (não avaliável)

A comparação entre o GIPSS *vs* DIPSS *plus* foi realizada em 151 (65,3%) casos. Em 59 (39%) casos houve concordância entre os grupos de risco. Em 92 (60,9%) houve discordância, sendo que em 47 (31,1%) o MIPSS70 elevou o grau de risco em relação ao IPSS, e em 45 (29,8%) o diminuiu. A maior parte das incongruências se concentrou em 75 pacientes classificados como GIPSS intermediário 1 e intermediário 2, que corresponderam a 81,5% do total de casos onde houve incongruência. Os valores encontrados estão na tabela 14.

Tabela 14 – Comparação entre GIPSS *e* DIPSS *plus* em 151 pacientes com MF

	DIPSS *plus*				
GIPSS	**Baixo**	**Int-1**	**Int-2**	**Alto**	**NA**
Baixo	9	4	6	0	0
Int-1	16	28	25	3	0
Int-2	6	18	18	7	0
Alto	1	3	3	4	0
NA	7	17	11	6	40

DIPSS *plus* (escore prognóstico internacional dinâmico revisado); GIPSS (escore prognóstico internacional mutacional revisado versão 2.0); Int (intermediário); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2); NA (não avaliável)

A comparação entre o GIPSS *vs* MIPSS70 *plus* foi realizada em 151 (65,3%) casos. Em 89 (58,9%) destes casos houve concordância entre os grupos de risco. Em 63 (41,7%) houve discordância; em 42 (27,8%) o MIPSS70 *plus* elevou o grau de risco, e em 21 (13,9%) diminuiu. Em 58 pacientes classificados como GIPSS intermediário 1 e intermediário 2 ocorreu a incongruência, sendo 92,1% do total destes casos, conforme tabela 15.

Tabela 15 – Comparação entre GIPSS e MIPSS70 *plus* em 151 pacientes com MF

	MIPSS70 *plus*				
GIPSS	**Baixo**	**Int**	**Alto**	**Mto Alto**	**NA**
Baixo	19	0	0	0	0
Int-1	26	28	19	0	0
Int-2	1	10	36	2	0
Alto	0	0	5	6	0
NA	0	0	0	0	79

MIPSS70 *plus* (escore prognóstico internacional mutacional revisado); GIPSS (escore prognóstico genético); Int (intermediário); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2); Mt Alto (muito alto); NA (não avaliável)

A comparação entre o MYSEC-PM com o DIPSS *plus* foi realizada em 16 (65,3%) dos 20 pacientes com MF-PV e MF-TE. Em 8 (50%) casos houve concordância entre os grupos de risco. Em outros 8 (50%) houve discordância, sendo que em 2 (12,5%) o MYSEC-PM elevou o grau de risco em relação ao DIPSS *plus*, e em 6 (37,5%) o grau de risco diminuiu, conforme tabela 16:

Tabela 16 – Comparação entre MYSEC e DIPSS *plus* em 16 pacientes com MF-PV e MF-TE

	MYSEC-PM				
DIPSS plus	**Baixo**	**Int-1**	**Int-2**	**Alto**	**NA**
Baixo	1	1	0	0	37
Int-1	2	5	0	0	61
Int-2	0	3	2	1	57
Alto	0	1	0	0	19
NA	3	1	0	0	36

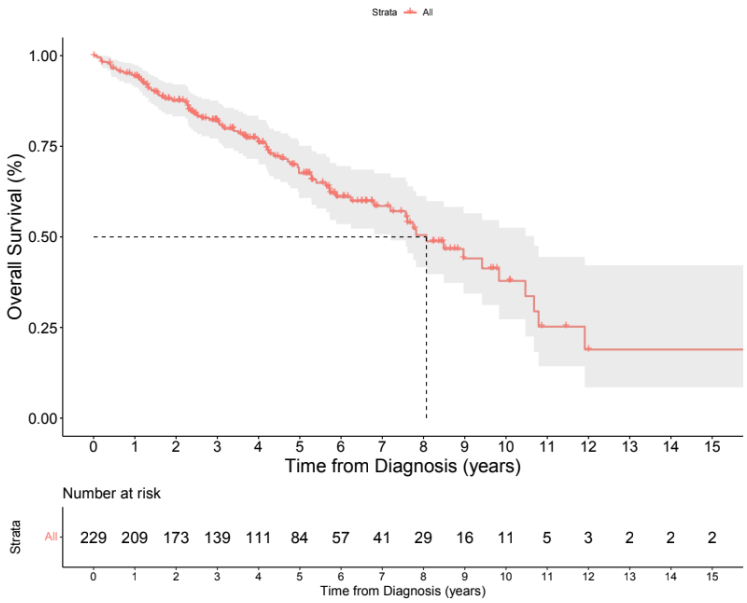
DIPSS *plus* (escore prognóstico internacional dinâmico revisado); MYSEC-PM (escore prognóstico para mielofibrose secundária a policitemia vera e trombocitemia essencial); Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2); NA (não avaliável)

11.7 Análise de sobrevida

O seguimento médio foi de 5,3 anos (CI 95%, 4,6 – 5,9), com uma média de sobrevida global de 8,1 anos (CI: 95%, 7,2 – 10,7), com uma sobrevida estimada de 5 anos de 61% (53 – 70). A curva de sobrevida está mostrada na figura 1.

.

Figura 1 – Curva de sobrevida global



Na análise univariada, os fatores de risco sexo, hemoglobina, contagem de leucócitos, contagem de blastos em sangue periférico, presença de mutação *JAK2* V617F, presença de mutação *CALR*, necessidade transfusional, região de origem, grau de fibrose de medula óssea, uso de ruxolitinibe, mielofibrose secundária e estratificação pelo MIPSS70 *plus*, MIPSS70 *plus* 2.0 não foram associados a sobrevida. A idade avançada e pacientes TN mostraram uma associação com menor sobrevida. Tamanho do baço mostrou uma tendência a uma menor sobrevida. A estratificação pelos IPSS, DIPSS, DIPSS *plus*, e o grupos de risco MIPSS70 alto risco e MIPSS70 plus alto e muito alto risco mostraram-se estatisticamente significativos em diferença da sobrevida. Esses dados estão mostrados na tabela 17.

Tabela 17 – Análise univariada de fatores de risco para sobrevida em 230 pacientes com MF

Variável	HR (95% CI)	*p*
Idade (continuo)	1,02 (1,01 – 1,04)	0,008
Sexo (ref : feminino)	1.8 (1,13 – 2,86)	0,013
Hemoglobina (continous)	0,81 (0,73 – 0,89)	<0,0001
Leucocitos (continous)	1,01 (1,0 – 1,02)	<0,0001
Blastos em SP (continous)	1,12 (1,01 – 1,24)	0,031
Baço (continous)	1,03 (1,01 – 1,06)	0,027
***JAK2* (ref: negativo)**	0,7 (0,43 – 1,14)	0,15
***CALR* (ref: negativo)**	0,69 (0,39 – 1,25)	0,23
***ASXL1* (ref: negativo)**	0,946 (0,552-1,62)	0,84
***EZH2* (ref: negativo)**	1 (0,554-1,82)	0,99
***IDH1* (ref: negativo)**	1,37 (0,621-3,05)	0,43
***IDH2* (ref: negativo)**	1,28 (0,309-5,33)	0,73
***U2AF1* (ref: negativo)**	3,96 (0,537-29,3)	0,18
***SRSF2* (ref: negativo)**	5,95 (2,5-14,2)	<0,0001
Triplo negativo (Ref: NÃO)	2,95 (1,63 – 5,33)	0,00036
Dep Transfusional (Ref: NÃO)	3,42 (2,15 – 5,44)	<0,0001
Região (Ref: GO)	0,64 (0,4 – 0,99)	0,048
Grau de Fibrose (Ref: 0)		
1	1,81 (0,56 – 5,9)	0,318
2	0.92 (0,30 – 2,76)	0,889
3	1,11 (0,4 – 3,1)	0,832
4	0,74 (0,18 – 2,98)	0,674
Tipo de Mutação *CARL*		
1	0,63 (0,32 – 1,25)	0,19
2	0,89 (0,34 – 2,25)	0,79
IPSS (ref. IPSS 0)		
Intermediário 1	3,33 (1,5 – 7,3)	0,00281
Intermediário 2	9,67 (4,2 – 22,1)	<0,0001
Alto	15,9 (6,6 – 38,6)	<0,0001

Comentado [IB11]: TEM QUE SER COM VÍRGULA AQUI NO BRASIL E NÃO PONTO. COMECEI A TROCAR MAS CANSEI.

Comentado [IB12]: Mudei para <0,0001 e os outros também

Tabela 17 – Análise univariada de fatores de risco para sobrevida em 230 pacientes com MF (cont.)

DIPSS (ref. DIPSS 0)		
Intermediário 1	7,6 (1,8 – 31,7)	0,005
Intermediário 2	16,6 (3,9 – 68,9)	0,0001
Alto	32,1 (6,7 – 151,7)	<0,0001
DIPSS *plus* (ref. DIPSS *plus* 0)		
Intermediário 1	11,0 (1,48 – 81,8)	0,02
Intermediário 2	26,7 (3,6 – 195,1)	0,0012
Alto	30,1 (3,9 – 230,6)	0,01
MIPSS70		
Intermediário	2,13 (0,5 – 8,9)	0,3
Alto	8,63 (1,98 – 37,5)	0,004
MIPSS70 *plus*		
Intermediário	2,13 (0,5 – 8,9)	0,29
Alto	3,22 (1,41 – 7,35)	0,005
Muito Alto	3,61 (1,03 – 12,7)	0,04

Comentado [IB13]: Não consegui arrumar as linhas que estão desalinhadas.

Na análise multivariada, a condição de ser TN, e a estratificação pelo IPSS permaneceram como fatores de risco para sobrevida. Estes achados estão demonstrados na tabela 18 e na figura 2.

As análises de sobrevida para os pacientes mutados para a mutação sRSF2, os escores IPSS, DIPSS, DIPSS *plus*, MIPSS70, MIPSS70 *plus*, pacientes com MF-PV e MF-TE, pacientes TN e pacientes que utilizavam ruxolitinibe estão nas figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e tabelas 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27.

Tabela 18 – Análise multivaridada de fatores de risco para sobrevida em 230 pacientes com MF

Variável	N	%	Pt est	Baixo	Alto	RR	IC95%	*p*
Gênero Masculino	97	53	1,3	0,72	2,3	1,3	(0,72-2,3)	0,39
Baço (cm)	182	100	1,01	0,97	1,05	1,01	(0,97-.05)	0,72
SRSF2 +	7	4	1,5	0,53	4	1.5	(0,53-4)	0,46
TN	27	15	2,7	1,43	5,1	2.7	(1,43-5,1)	0,002
IPSS int 1	67	37	3.6	1,44	8,9	3.6	(1,44-8,9)	0,006
IPSS int 2	36	20	7,7	2,89	20,6	7.7	(2,89-0,6)	<0,001
Alto	24	13	13,9	4,7	41,2	13.9	(4,7-41,2)	<0,001

Pt est (ponto estimado)

Figura 2 – Análise multivaridada de fatores de risco para sobrevida

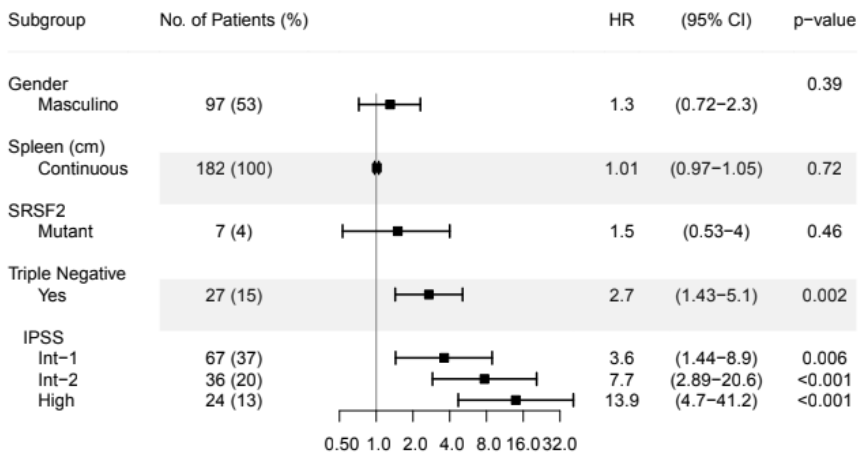


Figura 3 - Curva de sobrevida em mutados e não mutados para SRSF2

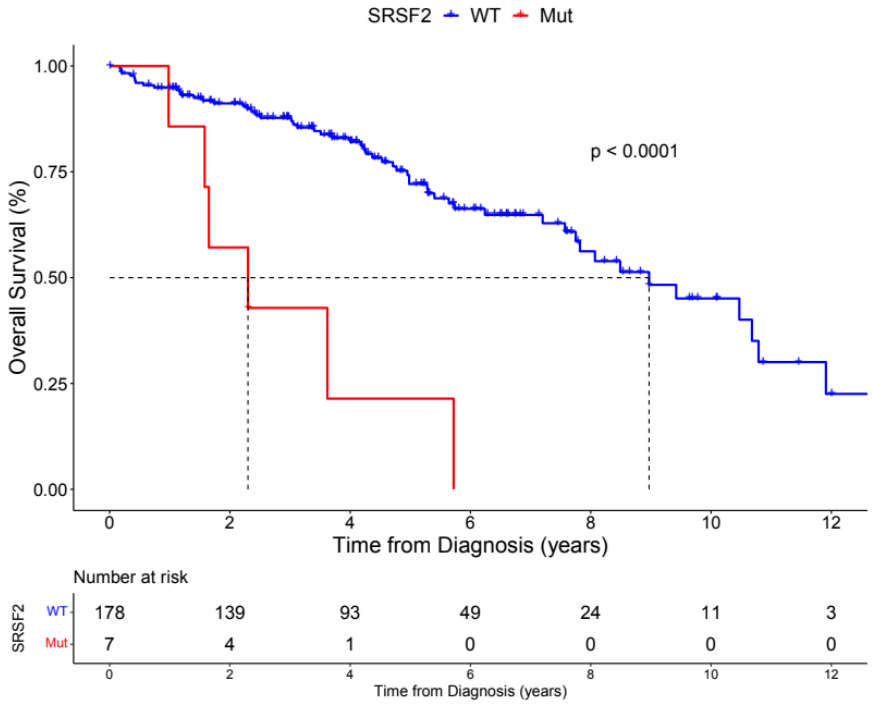


Tabela 19 – Sobrevida comparativa de pacientes mutados para SRSF2 e não mutados

SRSF2	Média (anos)	6 anos (%)	*p*
Não mutado	8,9 (7,7 – 11,9)	66% (58 - 76)	<0,0001
Mutado	2,3 (1,58 - NA)	NR	

Figura 4 – Curva de sobrevida estratificada pelo IPSS

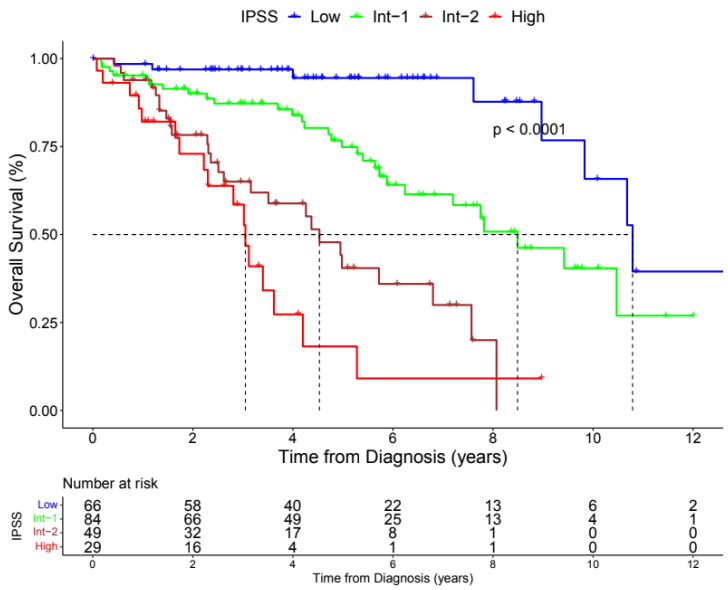


Tabela 20 – Sobrevida estratificada pelo IPSS

IPSS	Média (anos)	6 anos (%)	*p*
Baixo	10,79	94 – 100	*p* < 0,0001
Int-1	8,49	64 (52 – 78)	
Int-2	4,53	8 (22 – 58)	
Atlo	3,03	8 (1 – 53)	

Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2

Figura 5 – Curva de sobrevida estratificada pelo DIPSS

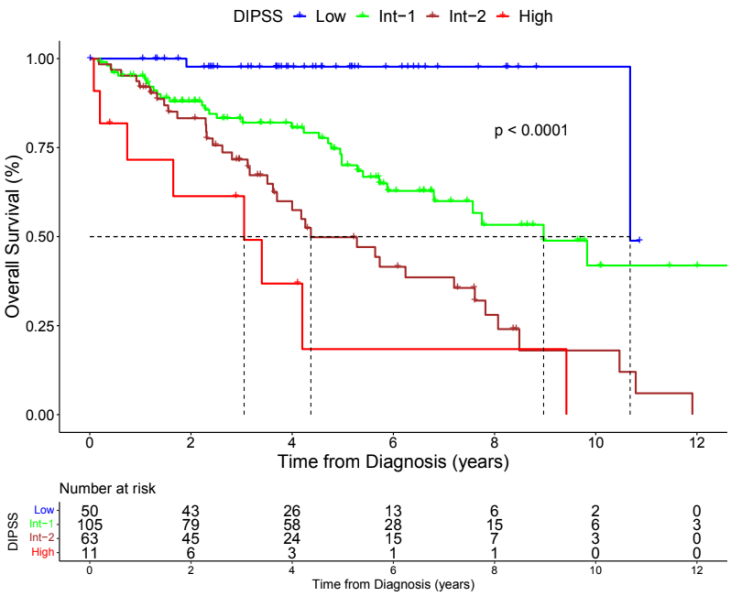


Tabela 21 – Sobrevida estratificada pelo DIPSS

DIPSS	Média (anos)	6 anos (%)	*p*
Baixo	10,7 (10 - NA)	98 (93 - 100)	<0,0001
Intermediário 1	8,9 (6,8 - NA)	63 (52 - 75)	
Intermediário 2	4,4 (3.7 - 7.9)	41 (29 - 59)	
Alto	3,0 (7 - NA)	18% (4 - 94%)	

Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2, NA (não alcançada)

Figura 6 – Curva de sobrevida estratificada pelo DIPSS *plus*

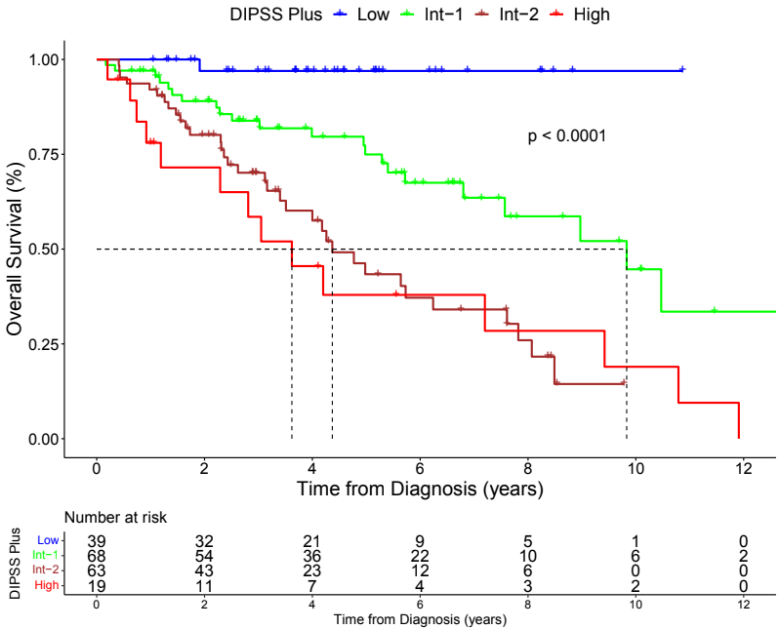


Tabela 22 – Sobrevida estratificada pelo DIPSS *plus*

DIPSS *plus*	Média (anos)	6 anos	*p*
Low	NA (NA - NA)	97% (91 - 100)	<0,0001
Intermediário 1	9,8 (7,6 - NA)	68% (55 - 82)	
Intermediário 2	4,4 (3,5 - 7.6)	37% (25 - 56)	
High	3,6 (2,3 - NA)	38% (20 - 72)	

Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2, NA (não alcançada)

Figura 7 – Curva de sobrevida estratificada pelo MIPSS70

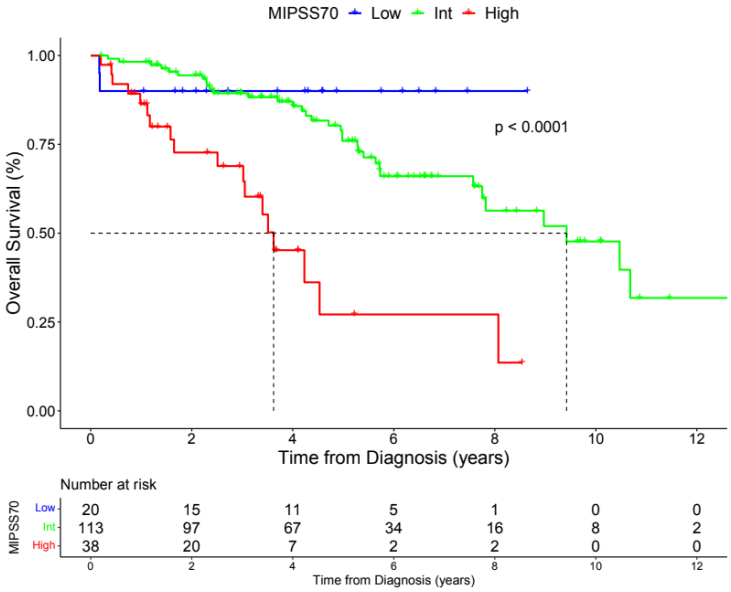


Tabela 23 – Sobrevida estratificada pelo MIPSS70

DIPSS *plus*	Média (anos)	6 anos	*p*
Baixo	17,9 (NA - NA)	90% (77 - 100)	<0,0001
Intermediário	10,9 (7,8 - NA)	66% (56 - 78)	
Alto	5,7 (3,0 - NA)	27% (12 - 63)	

Int-1 (intermediário 1); Int-2 (intermediário 2, NA (não alcançada)

Figura 8 – Curva de sobrevida estratificada pelo MIPSS70 *plus*

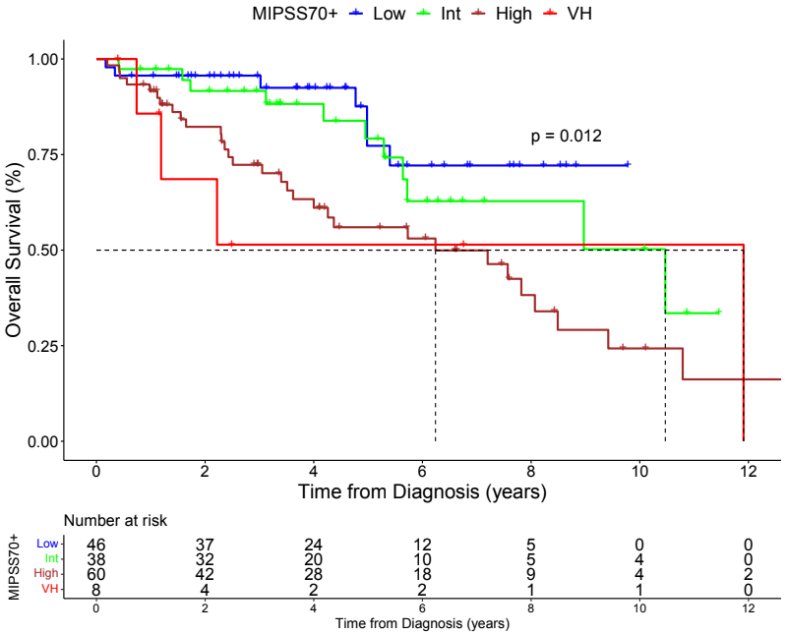


Tabela 24 – Sobrevida estratificada pelo MIPSS70 *plus*

MIPSS70 *plus* 2.0	Média (anos)	6 anos	*p*
Muito baixo	NA (NA - NA)	72% (56 - 94)	0,012
Baixo	10,5 (5,8 - NA)	63% (45 - 88)	
Intermediário	6,2 (4 - 9.4)	53% (40 - 70)	
Alto	11,9 (1,2 - NA)	51% (24 - 100)	

NA (não alcançada)

Figura 9 – Curva de sobrevida comparando MFP e MF-PV / MF-TE

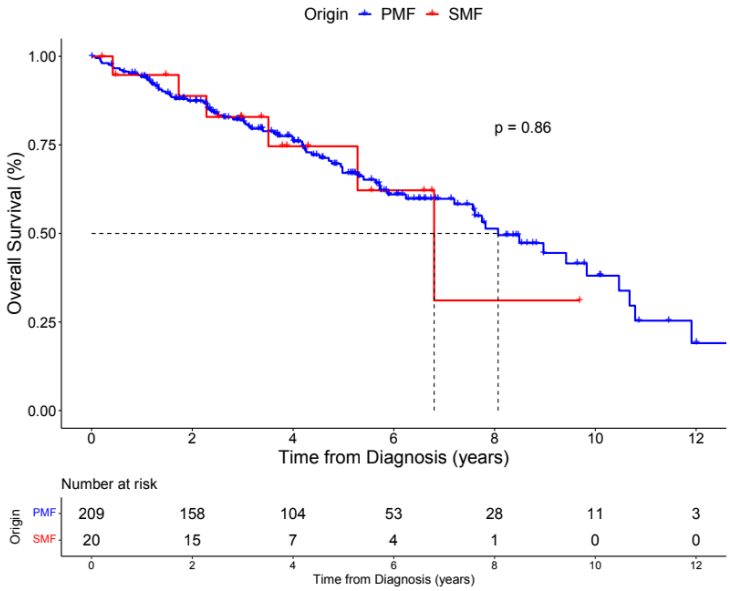


Tabela 25 – Sobrevida comparada de pacientes MFP e MF-PV e MF-TE

	Média (anos)	**6 anos**	***p***
Mielofibrose Primária	8,1 (7,6 - 11)	61% (53 - 70)	0,86
Mielofibrose secundária	6,8 (5,3 - NA)	62% (40 - 99)	

Figura 10 – Curva de sobrevida comparando pacientes triplo-negativos e não triplo-negativos

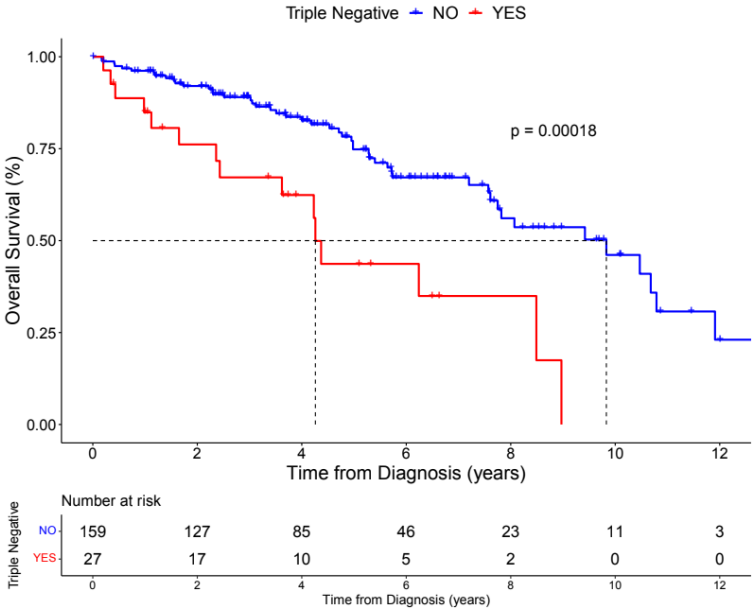


Tabela 26 – Sobrevida estratificada por triplo-negativos

Triplo-negativo	Média (anos)	6 anos	*p*
Não	9,8 (7,8 - NA)	67% (59 - 77)	0,0002
Sim	4,9 (3,6 - NA)	43% (26 - 73)	

NA (não alcançada)

Comentado [IB14]: idem

Figura 11 – Curva de sobrevida comparando pacientes que utilizavam ruxolitinibe e aqueles que não utilizavam

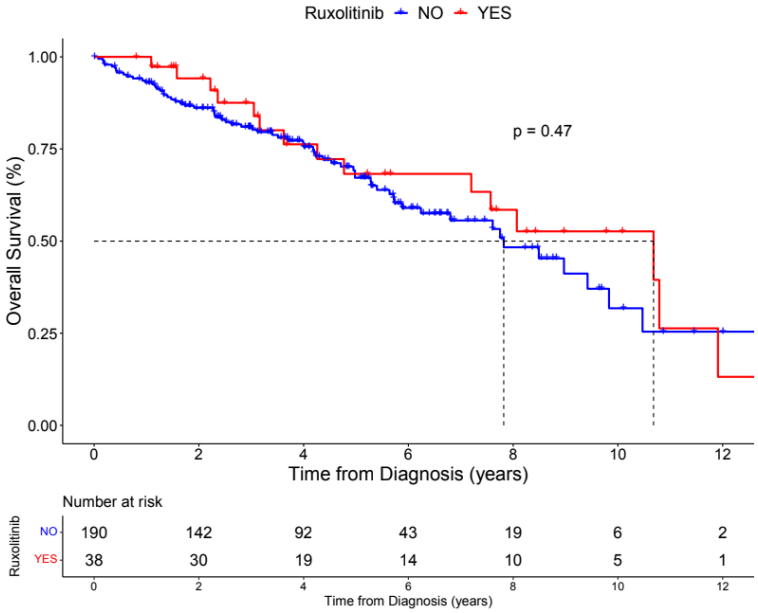


Tabela 27 – Sobrevida comparativa de pacientes que utilizavam ruxolitinibe e aqueles que não utilizavam

Triplo-negativo	Média (anos)	6 anos	*p*
Não	7,8 (6,2 – 10,5)	59% (51 - 69)	0,47
Sim	10,7 (7,2 - NA)	68% (53 - 88%)	

NA (não alcançada)

5 DISCUSSÃO

5.1 Dados demográficos

Estudos quanto à frequência e impacto das mutações e alterações de cariótipo em pacientes com MFP no Brasil são escassos; a maioria envolve um número pequeno de pacientes e não aplicam os índices prognósticos mais recentes. Nosso estudo é o maior estudo de pacientes brasileiros com MF dentre os publicados em periódicos indexados até a presente data, tanto em número de pacientes (230 pacientes) como em número de centros participantes (8 centros). Também é o único a aplicar nesta população todos os principais escores prognósticos, além de estudar a sobrevida desta população de maneira estratificada. (54, 64-73)

Dos 241 casos inicialmente recrutados, em 11 (4,5%) o diagnóstico inicial de MF estava incorreto e foram excluídos da análise. Embora seja um percentual pequeno, ele é significativo, ainda mais levando-se em consideração que alguns destes casos eram acompanhados em centros de referência e com diagnóstico firmado. Este dado alerta para a possibilidade de que essa margem de erro possa ser muito maior na prática clínica do nosso país, onde o arsenal laboratorial e a experiência profissional podem não estar tão disponíveis para a confirmação diagnóstica fora de centros de referência.

A média de idade de 65 anos encontrada é igual a media de 65 anos (14 – 92 anos) encontrada no levantamento de 1000 pacientes consecutivos com NMPs acompanhados na Clínica Mayo.(18) Foi muito próxima da encontrada do estudo original do IPSS, que foi de 64 anos e igual à estudada para o escore DIPSS *plus*, que foi 65 anos. Alguns estudos nacionais relatam uma média de idade que variando de 59 a 72 anos. Entretanto, como já relatado, estes estudos são com um número pequeno de pacientes (variando de 27 a 141 pacientes), envolvendo poucas instituições, e a maioria de um único centro.(64, 66, 67, 69, 71) O maior estudo brasileiro publicado avaliando a idade média, com 141 pacientes dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, encontrou uma idade média de 65 anos (30 a 81 anos) em pacientes com MFP *JAK2* V617F positivos,

54 anos (21- 85 anos) para os *CALR* positivos e 60,5 anos (33 – 73) para os TNs, mas não relate a idade média global.(69) Assim, baseado nos nossos achados, os pacientes com MF no Brasil parecem ter uma média de idade próxima a encontrada nos grandes estudos publicados.

Embora boa parte desta população seja idosa, 153 (77%) eram menores de 70 anos e potencialmente elegíveis para TMO-A, onde os escores MIPSS70, MIPSS70 *plus* 2.0 e GIPSS são especialmente úteis.(23, 50, 51) Isso reforça a necessidade de termos disponíveis os meios necessários para classifica-los da melhor maneira possível, pois boa parte dos casos poderia vir a se beneficiar dessa avaliação prognóstica mais acurada.

A maioria (79%) dos pacientes apresentava um grau de fibrose de medula óssea maior que 1. Entretanto, a gradação de fibrose não foi realizada pela mesma metodologia em todos, sendo que muitos pacientes tiveram seu diagnóstico antes de 2016, portanto antes das últimas recomendações de gradação de fibrose da OMS de 2016.(15) Nosso estudo mostra também que em 9 (4%) dos casos o grau de fibrose não foi relatado. A graduação de fibrose e a padronização dos laudos de biópsia de medula óssea utilizando as recomendações da OMSde 2016 para todos pacientes de MF no Brasil é essencial para o seu diagnóstico correto, para a diferenciação de MFP pré-fibrótica e fibrótica, e para o estudo e o seguimento destes casos.(15)

O percentual (12,2%) dos pacientes que não realizou pesquisa da mutação *JAK2* V617F antes de serem admitidos no estudo é pequeno, se levarmos em consideração o baixo acesso da nossa população ao exame, em especial no Sistema Único de Saúde (SUS). Entretanto, vale ressaltar que todos estavam sendo acompanhados em centros de referência, muitos dos quais realizam o exame em seus laboratórios e o oferecem sem custo ao doente, o que pode explicar essa percentagem pequena de não realização. A positividade da mutação *JAK2* V617F antes de serem recrutados para o estudo foi de 59,9%, um percentual muito próximo do que é descrito.(10, 11, 74) Isso pode sugerir que na maioria dos casos o diagnóstico de MF foi guiado e posteriormente firmado não só pela positividade do exame, mas pela suspeição clínica fundamentada, com confirmação laboratorial e avaliação anatomopatológica. Este percentual de

positividade para a mutação *JAK2* V617F foi de 54,5% na nossa avaliação, corroborando estas considerações.

Observamos nesta população que poucos pacientes (16%) estavam usando ruxolitinibe. Uma parte considerável dos casos se encontrava dentro de índices prognósticos mais graves. Por exemplo, olhando-se o índice prognóstico dinâmico mais simples e facilmente disponível na prática clínica, o DIPSS, 32% dos pacientes foram classificados como DIPSS intermediário 2 ou alto risco. De acordo com as diretrizes vigentes, deve-se considerar o uso de ruxolitinibe em pacientes sintomáticos e/ou com doença em grau avançado. Embora vários fatores clínicos devem ser levados em consideração quanto a esta prescrição, certamente este é um número muito baixo de pacientes utilizando o ruxolitinibe, o que reflete sem dúvida o baixo acesso dos pacientes brasileiros a medicação. Devemos ainda considerar novamente que todos estavam sendo acompanhados em centros universitários e de referência, e de que uma parcela (não escrutinada) dos que utilizavam a medicação era por participarem na época do estudo clínico JUMP. (13, 38, 75-77)

5.2 Dados de análise mutacional

A proporção de pacientes que foi positiva para a mutação *JAK2* V617F foi de 54,5% dos testados. Já a percentagem de mutações na região *CALR* foi de 29,4% dos testados, e da mutação *MPL* foi de 2,2%. Em 11,7% dos casos não foi detetada nenhuma mutação diretora, sendo classificados como TNs. Com exceção da frequência da mutação *MPL*, essa distribuição se encontra bem próxima das encontradas na literatura.(9-11, 28) Esses dados falam a favor de uma suspeição diagnóstica baseada no quadro clínico, laboratorial e anatomopatológico, não tendo a positividade da mutação *JAK2* V617F, muitas vezes a única disponível na prática clínica para a maioria dos pacientes brasileiros, como fator principal de suspeição. Em apenas três casos a pesquisa da mutação *CALR* havia sido realizada antes do recrutamento do estudo. A proporção de positividade para as mutações *JAK2* V617F e *CALR* é muito próxima da encontrada no estudo com 141 casos de pacientes do Rio de Janeiro e de São Paulo, publicado em 2016 por Monte-Mor e cols.,(69) e do estudo com

Comentado [IB15]: eu mudei tudo para cols. Ao invés de colaboradores. Veja se tem mais no texto que eu possa ter pulado.

51 casos de três centros de referência em São Paulo publicado em 2020 por Porto-Soares e cols.(70) Entretanto, a proporção de pacientes positivos para a mutação *JAK2* V617F foi de 77% no estudo publicado em 2012 por Silva e cols., com 11 pacientes com MF de Pernambuco. (65) Observando-se os dados brasileiros disponíveis, poderia se inferir grosseiramente que com o passar dos anos a suspeita diagnóstica de MF foi ficando menos dependente da positividade da mutação *JAK2* V617F, ou ainda de que os recursos para o diagnóstico variem de região para região. Entretanto os dados disponíveis são muito escassos para poder se chegar a alguma conclusão fundamentada quanto a este quesito.

Cerca de 35,6% dos pacientes apresentou uma HMR Em 29,1% pelo menos 2 destas mutações estavam presentes, e em 7,8% pelo menos três estavam presentes. Estas proporções de casos com mutações *ASXL1*, assim a quantidade de casos onde ocorrem pares ou triplos, se aproxima do descrito; por outro lado, as mutações *SRSF2* e *U2AF1* foram encontradas em menor quantidade.(28) Isso demonstra a importância dessa análise em nossa população, onde a estratificação pelos escores mutacionais irá reclassificar uma porção considerável dos pacientes, a exemplo do que se tem observado na literatura médica, discutida com mais detalhes mais adiante. Além da caracterização prognóstica mutacional interferir na indicação de TMO-A, discutido adiante com mais detalhe, a determinação das mutações de alto risco pode ter também um impacto na terapia medicamentosa. Como se sabe, o ruxolitinibe tem grande impacto no alívio dos sintomas e na qualidade de vida dos pacientes com MF, e possivelmente um impacto na sobrevida.(78-80) Contudo, nem todos apresentam uma resposta uniforme, alguns poucos são refratários, e muitos irão perder a resposta ao longo do tempo.(81) O impacto negativo da maioria das mutações de alto risco na MFP parece ser sobrepujado pelo ruxolitinibe, mas a presença de 3 ou mais mutações e mutações na via RAS têm sido correlacionadas com uma menor resposta a medicação. (82, 83)

A população de pacientes TNs em nosso estudo foi de 11,7%. A mutação *SRSF2* pareceu estar mais associada a este grupo de pacientes, embora sem uma correlação estatística significativa (p=0.06). Em relação as outras mutações de alto risco aqui estudadas e alterações de cariótipo de medula óssea (CMO) e

cariótipo de sangue periférico (CSP), não houve uma associação estatística. Estes dados estão mostrados na tabela 5, em “resultados”. A ausência de uma maior proporção de mutações de alto risco e de alterações de cariótipo desfavoráveis em pacientes TNs também foi relatada em outros levantamentos.(25, 28, 84).

Os pacientes TNs se mostraram mais dependentes de transfusão (p=0,003). Esta característica também foi encontrada no estudo da aliança Mayo-Careggi, com 1095 pacientes, sendo 106 (9,7%) TNs.(84) Nosso pacientes TN também apresentaram uma sobrevida menor, discutido adiante. Não houve diferença na idade ou no tamanho do baço, mas apresentaram uma média na contagem leucocitária e plaquetária maior dos que eram positivos para uma mutação diretora, conforme mostrado na tabela 4, em “resultados”.

Mutações diretoras variantes não canônicas, em especial mutações *JAK2 V617F* e *MPL*, e mutações com frequência alélica baixa, em especial a mutação *JAK2 V617F*, têm sido identificadas em uma parcela de pacientes com NMPs previamente considerados TNs, com a utilização e/ou combinação de diferentes técnicas de NGSs.(85-88) Assim, a quantidade de casos realmente TNs pode ser menor que a encontrada na prática clínica. A identificação e compreensão dos casos TNs é fundamental, pois dependem de uma caracterização clínica, molecular, cariotípica e anatomopatológica mais acurada e detalhada, pois não possuem mutações diretoras para auxílio diagnóstico, assim como para afastar causas reacionais ou outras doenças hematológicas neoplásicas como SMDs e outras síndromes mieloproliferativas, com evidentes implicações na sua abordagem clínica e terapêutica.(89)

5.3 Dados citogenéticos

Em 23,5% dos casos o CMO não foi coletado, uma proporção significativa dos casos. Isso reflete a nossa realidade, onde esse exame muitas vezes não está disponível, especialmente no SUS. Já as taxas de falha de obtenção de metáfases, tanto no CMO (15,4%) como de sangue periférico (44,9%) refletem as dificuldades técnicas que enfrentamos em relação ao procedimento. Essa maior taxa de falha de crescimento do CSP em relação ao CMO foi

provavelmente causada pelo transporte da amostra para o laboratório central do estudo, pois muitos dos CMO foram realizados dentro das próprias instituições participantes, na época do seu diagnóstico.

Observamos que no tocante ao CSP houve uma relação estatisticamente significativa da taxa de sucesso na obtenção de metáfases para análise com contagens leucocitárias mais elevadas (p=0,01) e grau de fibrose medular mais acentuado (p=0,002). Baseado nestes achados, poderíamos inferir que isso se deve a uma maior circulação de células precursoras em sangue periférico nos pacientes com fibrose mais marcada. Entretanto, não foi realizada uma determinação de células CD34 circulantes, e a gradação de fibrose não foi feita de uniforme e centralizada. Estudos envolvendo estes fatores, com um número maior de pacientes, poderiam vir ajudar a confirmar esses achados e elucidar essa questão.

As alterações cromossômicas mais frequentes encontradas foram a trissomia do cromossomo 9 (8 casos), de significado prognóstico favorável quando não associada a alterações de mau prognóstico, e a trissomia do 8, de mau prognóstico. A deleção 20q, deleção 13p e nulissomia do Y foram identificadas 4 vezes cada uma, todas alterações de prognóstico favorável. Outras 31 alterações de prognóstico desfavorável além da trissomia do 8 foram identificadas, sendo apenas a monossomia do 7 encontrada duas vezes, e todas as outras apenas uma vez. Isso mostra uma grande diversidade de alterações citogenéticas, o que poderia inviabilizar a pesquisa apenas por FISH, seria muito dispendiosa e provavelmente infrutífera, sendo essencial a análise cariotípica clássica detalhada, indo de encontro conforme já demonstrado. Num estudo de 42 casos de MF a análise por FISH foi capaz de detetar alterações cariotípicas em apenas 33% dos casos, não sendo capaz de substituir a análise citogenética clássica. (58)

A avaliação de CSP elevou de 64,8% para 82,6% a disponibilidade de resultados de cariótipo para inserção em escores prognósticos. Ainda, o CSP influenciou a classificação pelos escores DIPSS *plus*, MIPSS *plus*, MIPSS *plus* 2.0 e GIPSS em 8 casos, sendo que em 4 deles o CMO foi normal. Nestes 4 casos a diferença entre a data das duas coletas é de pelo menos dois anos,

sendo sempre a coleta do CSP posterior a coleta do CMO. Isso pode sugerir que houve evolução clonal nestes 4 casos, embora os locais onde os exames foram realizados tenham sido diferentes. Em um dos casos (caso 7, tabela J, em "resultados") foi encontrada alteração de cariótipo apenas no CMO e não no CSP. A alteração parece ter sido oriunda de uma célula hiperdiplóide, mais raramente encontrada em sangue periférico.

A indisponibilidade de resultados de CMO na MF é descrita na literatura médica. No estudo original do DIPSS *plus*, numa população de 923 pacientes acompanhados na Clínica Mayo, em 65 (7%) pacientes o exame não havia sido realizado, e em 40 pacientes, correspondendo a 4,3% do total de casos e 4,7% dos que colheram, não houve obtenção de metáfases adequadas para análise. Assim, foram estudados apenas 793 (85,9%) dos casos inicialmente selecionados. No estudo que definiu o MYSEC-PM, o CMO estava disponível em apenas 340 (43,5%) dos 781 pacientes com MF-PV e MF-TE, sendo assim este dado excluído da análise.(20) Em um estudo coreano envolvendo 200 pacientes com NMP, em 15,5% o CMO não estava disponível.(43) Portanto, essa dificuldade é mais comum do que possa parecer, e um dado fundamental para a classificação prognóstica mais precisa pode estar ausente para muitos pacientes, em várias realidades.

Os estudos sobre o uso de CSP em MFP são muito escassos.(56, 58) Alguns estudos têm demonstrado sua utilidade, associado ou não ao FISH, em situações específicas nas SMDs, como ausência de resultados de CMO ou no seu seguimento e monitoramento terapêutico.(90-93). Nosso estudo demonstrou que a realização e utilização dos CSP foi bastante útil, em especial naqueles pacientes cujo resultado do CMO não estava disponível. Também sugere que possa ser útil no acompanhamento destes casos, a fim de detetar alterações adquiridas ao longo do tempo, evitando-se o desconforto e o maior custo inerentes a coleta periódica do CMO. Vale ressaltar que no nosso estudo, por questões orçamentárias e éticas, os CSP e CMO não foram realizados simultaneamente, sendo os resultados de CMO aqueles informados na CRF. Também é importante ressaltar que todos os CSP foram realizados no mesmo serviço, mas os CMO foram feitos em serviços bastante distintos. Outros estudos

envolvendo coletas de CMO e CSP simultâneas, com processamento e análise centralizada de todos os resultados, poderão oferecer mais respostas para um recurso propedêutico potencialmente útil.

5.4 Aplicação dos escores prognósticos e sua comparação

Com relação aos escores clássicos, observamos quanto ao IPSS que 29% de pacientes eram de baixo risco, 36% de risco intermediário 1, 22% de risco intermediário 2 e 13% de alto risco. No estudo original do IPSS se observou que 22% dos pacientes eram de baixo risco, 29% de risco intermediário 1, 28% de risco intermediário 2 e 21% de alto risco.(20) No estudo que definiu o DIPSS *plus*, a população de 793 pacientes apresentava, no seu IPSS, risco baixo em 9%, risco intermediário 1 em 21%, risco intermediário 2 em 29% e alto risco em 43%.(22) Na população do estudo que definiu o MIPSS70 e o MIPSS70 *plus*, a distribuição do IPSS variou conforme a coorte, sendo que na coorte da Clínica Mayo a distribuição do IPSS foi de 46,7%, 27,1%, 14,1% e 12,1% e na coorte italiana foi de 48,7%, 26,8%, 14,2% e 10,3% respetivamente para baixo risco, risco intermediário 1, risco intermediário 2 e alto risco.(23) Estas diferenças entre os IPSS descritos também aconteceram em outros estudos nacionais. Nos estudos de Benites BD e cols., Souza MC e cols., e Nonino A e cols., a distribuição dos IPSS encontrados são baixo em 26%, intermediário 1 em 32%, intermediário 2 em 26%, alto em 31%; baixo em 11%, intermediário 1 em 44%, intermediário 2 em 29%, alto em 16%; e baixo em 18,5%, intermediário 1 em 37%, intermediário 2 em 7,4%, alto em 37%, respetivamente.(66, 67, 71)

Na nossa população tivemos uma predominância de pacientes com IPSS de risco baixo e intermediário 1 (65%), o maior valor percentual observado nos estudos nacionais publicados, e em relação aos estudos originais foi menor apenas do que a população estudada no estudo do MIPSS70 / MIPSS70 *plus*.(23) Ainda, apenas 13% estão no grupo de alto risco, o menor valor de todos os estudos citados, exceto o estudo do MIPSS70 / MIPSS70 *plus*.(23) A diferença no número de pacientes, na média de idade, época de publicação e local onde a população de cada estudo vivia, entretanto, deve ser levada em

consideração na comparação dos dados de IPSS e de outros escores encontrados no nosso estudo com os outros estudos. Para facilidade de visualização, estes dados estão expostos na tabela 28.

Quando observamos os resultados obtidos no DIPSS *plus*, a distribuição de baixo risco, risco intermediário 1, risco intermediário 2 e alto risco foi respetivamente 21%, 36%, 33% e 10%. Esta distribuição é diferente em relação ao estudo do DIPSS *plus* original, onde a distribuição entre os grupos foi de 8,3%, 21,9%, 45,4% e 24,3% pra baixo risco, risco intermediário 1, risco intermediário 2 e alto risco respetivamente.(22) No estudo do MIPSS70 / MIPSS70 *plus* a distribuição segundo o DIPSS *plus* foi de baixo risco, risco intermediário 1, risco intermediário 2 e alto risco respetivamente de 16,6%, 19,1%, 38,9% e 25,4% na coorte da Clínica Mayo e 15,9%, 19,4%, 39,3% e 25,4 no grupo italiano.(23) O estudo brasileiro que classifica pacientes pelo DIPSS *plus* foi o de Souza MC e cols., onde a distribuição entre baixo risco, intermediário 1, intermediário 2 e alto risco foi respetivamente de 13%, 27%, 35% e 24%.(67) Em relação ao DIPPS *plus* a nossa coorte apresenta o maior percentual de pacientes classificados em categorias menos graves de DIPSS *plus*, com 57% dentro das categorias baixo risco e risco intermediário 1, enquanto nos estudos do DIPSS *plus* original, do MIPSS70 / MIPSS70 *plus* original coorte da Clínica Mayo e coorte italiana e o estudo de Souza MC e cols. esta proporção foi de 30,9%, 31,7%, 35,3% e 40% respetivamente.(22, 23, 67) O percentual de pacientes de DIPSS *plus* alto risco da nossa população foi de 10%, e assim também difere da encontrada nos estudos do DIPSS *plus* original, do MIPSS70 / MIPSS70 *plus* original coorte da Clínica Mayo e coorte italiana e do estudo de Souza MC e cols., onde este percentual é de 24,3%, 25,1%, 25,4% e 24% respetivamente.(22, 23, 67) Estes valores estão na tabela 28.

O fato de termos uma maior percentagem de pacientes menos graves ao IPSS em comparação com a maioria dos estudos citados, e uma maior percentagem de pacientes menos graves ao DIPSS *plus* em relação a todos os estudos citados, guardadas as devidas proporções, pode refletir uma possível mortalidade mais precoce dos casos mais avançados, que assim não teriam tido oportunidade de serem recrutados para este estudo. É difícil pensar que temos condições socioeconómicas, sanitárias, médicas e terapêuticas melhores do que

os países de primeiro mundo onde foram recrutados os pacientes para os estudos originais do DIPSS *plus* e MIPSS70 / MIPSS70 *plus*, e que nossa população de pacientes com MF esteja verdadeiramente menos grave.(22, 23) Embora o estudo nacional de Souza MC e cols. apresente uma população mais grave de pacientes do que a nossa, e assim mais próxima neste quesito dos estudos originais citados, é um estudo com apenas 62 pacientes e restrito ao Estado de São Paulo.(67) Por outro lado, os nossos dados referentes aos escores moleculares não repetem essa desproporção, não corroborando essa hipótese, discutido a seguir.

Tabela 28 – Distribuição do IPSS e DIPSS *plus* nos vários estudos

Estudo (ref)	Este estudo	IPSS (20)	DIPSS *plus* (22)	MIPSS70/70 *plus* (23)		Estudos brasileiros		
Parâmetro				**C. Mayo**	**Itália**	**Benites BD (66)**	**Souza MC (67)**	**Nonino A. (71)**
IPSS								
Baixo (%)	29	22	9	46,7	48,7	26	11	18,5
Int-1 (%)	36	29	21	27,1	26,8	32	44	37
Int-2 (%)	22	28	29	14,1	14,2	26	29	7,4
Alto (%)	13	21	43	12,1	10,3	31	16	37
DIPSS *plus*		-						
Baixo (%)	21	-	8,3	16,6	15,9	-	13	-
Int-1 (%)	36	-	21,9	19,1	19,4	-	27	-
Int-2 (%)	33	-	45,4	38,9	39,3	-	35	-
Alto (%)	10	-	24,3	25,1	25,4	-	24	-
Idade	65 (55 – 72)	64 (10-90)	65 (14-92)	55,4 (14 – 70)	55,6 (18,5 – 69,8)	71 (31 – 92)	71 (40 – 91)	59 (35 – 84)
Número *	299 / 190	1054	793	490	261	74	62	27

Int-1 (intermediário 1), Int-2 (intermediário 2), * - número de pacientes

Quando aplicamos os escores mutacionais em nossa população observamos que 55,2% dos pacientes apresentavam escore MIPSS70 *plus* de menor risco (baixo risco e risco intermediário somados), e 44,8% de maior risco (alto e muito alto risco somados). Esses valores são bem próximos dos encontrados nos estudos do MIPSS70 *plus* coorte da Clínica Mayo e coorte italiana, MIPSS70 *plus* 2.0 e GIPSS, onde essas proporções aqui determinadas de menor risco e maior risco são respetivamente 43,3% e 52,7%, 50% e 49%, 47% e 53% e 43% e 57%.(50, 51) Neste caso, a disparidade de pacientes classificados como menos graves e mais graves em relação aos outros estudos internacionais originais é bem menos evidente do que a disparidade encontrada em relação ao IPSS e DIPSS *plus* anteriormente mostradas. O número de pacientes (152 casos) onde aplicamos o MIPSS70 *plus* é metade daquela onde foi aplicado o IPSS (229 casos), mas apenas um pouco menor daquela onde aplicamos o DIPSS *plus* (170 casos). O fato de termos uma disparidade muito menor com os escores moleculares fala contra a hipótese anterior de que houve uma mortalidade mais precoce dos casos mais avançados. Ainda, essa maior uniformidade entre os estudos em relação ao MIPSS70 *plus* favorece a impressão de que os índices prognósticos baseados em alterações mutacionais oferecem um prognóstico mais acurado, conforme será discutido mais adiante. Esses dados estão expressos na tabela 29.

A proporção de pacientes nossos no MIPSS70 *plus* 2.0 de menor risco (somados os riscos muito baixo, baixo e intermediário, e aqui agrupados para facilidade de comparação) é de aproximadamente 55,2%, e de alto risco (agrupados os de alto risco e muito alto risco), é de 44,8%. No estudo de Nonino A e cols. notamos que esta proporção é de 70,3% quanto ao menor risco somado, e 29,6% no alto risco somado. Apesar de ser o único estudo nacional que publicou essa classificação, e ser uma diferença expressiva, o número de pacientes (27 casos) daquele estudo é muito pequeno, prejudicando a comparação.(71) Por outro lado, a proporção encontrada nesse estudo se aproxima da encontrada no estudo original do MIPSS70 *plus* 2.0, onde a proporção de pacientes deste menor risco é de 40,6%, e a de alto risco é de 59,2%.(50) Assim, nossos dados são comparáveis ao estudo original. Vide tabela 29:

Tabela 29 – Distribuição do MIPSS70 *plus* / MIPSS70 *plus* 2.0 nos vários estudos

Estudo (ref) / Parâmetro	Este estudo (MIPSS 70 *plus* / versão 2.0)	MIPSS70 *plus (23)* C. Mayo	MIPSS70 *plus (23)* Itália	MIPSS70 plus 2.0	GIPSS (51)	Nonino A. (71)
MIPSS70 *plus* / versão 2.0						
Mt Baixo (%)	--- / 2,6	--- / ---	---/ ---	--- / 4,7	--- / ---	--- / 11,1
Baixo (%)	30,2 /24,3	27,3 / ---	9,6 / ---	24 / 17,2	27 / ---	--- / 33,3
Int (%)	25 / 28,2	20 / ---	41,4 / ---	19 / 18,7	20 / ---	--- / 25,9
Alto (%)	39,9 / 39,5	40,3 / ---	30,3 / ---	44 / 42,3	41 / ---	--- / 14,8
Mt Alto (%)	5,3 / 5,3	12,4 / ---	18,7 / ---	13 / 16,9	12 / ---	--- / 14,8
Idade	65 (55 – 72)	55,4 (14 – 70)	55,6 (18,5 – 69,8)	63 (NA – NA)	63 (19 – 89)	59 (35 – 84)
Número *	152	490	261	406	641	27

Ref (referência bibliográfica), Mt baixo (muito baixo), Int (intermediário 1), Mt alto (muito alto), NA (não disponível), * - número de pacientes

A acurácia dos índices prognósticos é sabidamente maior quando utilizamos dados moleculares e citogenéticos, e sua utilização em detrimento dos escores clássicos tem sido recomendada cada vez mais frequentemente.(13, 38, 39) Quando comparamos os dados obtidos ao DIPSS *plus* com os obtidos ao DIPSS (tabela 10, em "resultados"), observamos uma discrepância entre ambas as classificações de 16,4%, sendo que o DIPSS *plus* elevou a categoria de risco em 14,8% dos casos, e a diminuiu em 1,6% deles. Esta situação também foi observada no estudo original do DIPSS *plus*, onde houve uma discrepância em 26,1% dos casos, sendo que em 24% dos casos o DIPSS *plus* aumentou a classificação prognóstica, e diminuiu em 2,1% dos pacientes.(22) Isso demonstra mais uma vez que o DIPSS *plus* oferece uma maior acurácia, onde a incorporação de dados de cariótipo, contagem plaquetária e necessidade transfusional ao cálculo prognóstico também é importante em nossa população.

Esta reclassificação é importante. Um paciente que tenha sido classificado pelo DIPSS na categoria intermediário 1, onde a sobrevida média estimada é de 14 anos, quando reclassificado pelo DIPSS *plus* para intermediário 2 (bastando preencher um dos três fatores de risco ausentes no DIPSS, como contagem plaquetária < 100 x 10^9/dL, necessidade transfusional ou cariotipo desfavorável), terá agora uma expectativa de sobrevida média de 3 anos.(21, 22)

Na comparação do MIPSS70 com o IPSS observou-se uma discrepância em 45,6% dos casos, elevando a categoria de risco em 36,2% (tabela 11 em "resultados"). A proporção de casos em que o MIPSS70 aumentou o escore de risco no estudo original do MIPSS70 / MIPSS70 *plus* foi de 46%, também mostrando ocorrer uma reclassificação significativa. A comparação dos nossos resultados absolutos obtidos com o estudo original é mais complexa, pois além da distribuição de nossos casos ser muito diferente das coortes da Clínica Mayo e do grupo italiano, essas duas coortes também são muito distintas entre si.(23)

Em relação ao pareamento do MIPSS70 *plus* com o DIPSS *plus*, observamos que a discrepância ocorreu em 48,3%, com uma elevação do risco em 21,8% e uma diminuição do risco em 29,8% pelo MIPSS70 *plus*. Essa variação ocorreu de maneira semelhante no estudo original do

MIPSS70/MIPSS70 *plus*, onde 31,74% tiveram seu escore de risco aumentado e 17,7% tiveram seu escore de risco diminuído pelo MIPSS70 *plus*.(23)

Quando comparados o MIPSS70 *plus* com o MIPSS70 *plus* 2.0, o grau de divergência foi menor do que os anteriores, apenas em 8,5% dos casos. O fato dessa discrepância ser menor quando se compara ambos os escores já foi demonstrada, também ocorreu no estudo original do MIPSS70 *plus* 2.0, embora numa proporção maior do que a nossa. Neste estudo, pacientes classificados como de baixo risco pelo MIPSS70 *plus*, 20% foram reclassificados como de muito baixo risco, 68% mantiveram-se como baixo risco e 10% se mostraram como risco intermediário. Em 25% dos casos classificados como de alto risco pelo MIPSS70 *plus* foram reclassificados como de muito alto risco pelo MIPSS70 *plus* 2.0.(50) Provavelmente esta diferença se deva a termos tido uma frequência bem menor da mutação *U2AF1* (2%) do que a encontrada (11%) no estudo do MIPSS70 *plus* 2.0, e pela diferença substancial de pacientes estudados, 152 casos nossos contra 406 daqueles.(50)

No caso da nossa comparação dos pacientes classificados ao GIPSS com o DIPSS *plus*, foi encontrada uma discrepância em 60,9% dos analisados, sendo que o GIPSS elevou a categoria de risco em 31,1% e diminuiu em 28,8%. A maior parte dessas discrepâncias se deu naqueles classificados pelo GIPSS como de risco intermediário 1 e 2 (49,3%), conforme tabela 14 em “resultados”.

Quando comparamos o GIPSS com o MIPSS70 *plus*, houve discordância em 63 (41,7%) casos, sendo que em 42 (27,8%) o MIPSS70 *plus* elevou o grau de risco em relação ao GIPSS e o diminuiu em 21 (13,9%). Aqui também a maior parte das incongruências foi em 58 (38,4%) pacientes classificados como GIPSS intermediário 1 e intermediário 2 (tabela 15 em “resultados”).

Assim, observamos nessas duas comparações que pacientes classificados pelo GIPSS nos grupos intermediário 1 e 2 acabaram falhando de maneira significativa na estratificação prognóstica quando comparados com outros índices que utilizam dados clínicos, indo de acordo com o que já foi relatado em outros estudos internacionais.(16, 51) Embora o GIPSS seja um escore mais simples de ser calculado e esteja potencialmente livre de uma possível interferência de terapias medicamentosas em dados clínicos como

sintomas constitucionais, e laboratoriais como hemoglobina, leucócitos, contagem de blastos em sangue periférico, a aplicação de outros escores que incorporam dados clínicos, como o MIPSS70 *plus* 2.0, foi recomendada pelo próprio autor principal destes estudos quando o paciente se encontra nos grupos intermediários 1 e 2 do GIPSS.(13)

A comparação do escore MYSEC-PM versus DIPSS *plus* foi possível em apenas 63,3% dos pacientes com MF-PV e MF-TE. A discrepância ocorreu em 50% dos casos, mas infelizmente, o número pequeno da amostra não nos permite chegar a conclusões mais elaboradas. É necessário estudarmos um número maior de casos nacionais para podermos estabelecer hipóteses mais sólidas em relação a nossa população de pacientes. O prognóstico dos pacientes com MF-PV ou MF-TE parece ser melhor do que o dos pacientes com MFP, e o escore MYSEC-PM foi estabelecido para a avaliação prognóstica mais refinada destes casos.(33) Entretanto, embora tenha recrutado um número muito significativo de casos (685 pacientes), o estudo não incorporou na análise alterações de cariótipo ou mutações de alto risco.(33) Alterações mutacionais podem ter impacto neste grupo de pacientes. Por exemplo, a presença da mutação *SRSF2* mostrou impacto prognóstico num grupo de 359 pacientes com MF-PV ou MF-TE, onde as mutações *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1* e *IDH2* foram estudadas.(94) Numa avaliação de 59 pacientes com MF-PV ou MF-TE, a presença de mutações *ASXL1* e *TP53*, isoladas ou em associação, tiveram impacto na sobrevida.(95) Por outro lado, enquanto o MYSEC-PM se mostrou melhor preditor do que os escores clássicos, essa diferença pode não ser tão significativa. As variáveis do IPSS e DIPSS e as três adicionais do DIPSS *plus* foram estudadas em 125 pacientes com MF-PV ou MF-TE, e com exceção dos sintomas constitucionais, todas se mostraram significativas, e os escores IPSS, DIPSS e DIPSS *plus* se mostraram adequados em relação a sua performance.(96) Ainda, o MYSEC-PM foi comparado ao IPSS em um estudo com 262 pacientes do Registro Espanhol de Mielofibrose. Embora tenham encontrado uma melhor performance do MYSEC-PM quando comparado ao IPSS pelos testes estatísticos R^2 e *Harrell´s C-statistic*, os autores alertam que a idade teve um peso muito grande no MYSEC-PM, em especial nos grupos de alto risco, podendo ter diminuído a importância de outros fatores como sintomas

constitucionais, anemia e quantidade de blastos circulantes nestes cálculos. Este possível desvio poderia ter levado a uma redução significativa no número de casos de alto risco, e assim recomendam que mais de um escore seja utilizado quanto a decisão de submeter um paciente com MF-PV ou MF-TE ao TMO-A.(97) Outro estudo comparou o MYSEC-PM ao DIPSS em uma população de 159 pacientes com MF-PV ou MF-TE submetidos a TMO-A, e embora O MYSEC-PM tenha mostrado melhor acurácia que o DIPSS para predizer a sobrevida, a capacidade de predição foi considerada moderada (C-index = 0,636).(98) Neste estudo os autores recomendam que o MTSS também seja aplicado neste tipo de avaliação.(37)

Assim, decidimos manter os pacientes com MF-PV ou MF-TE em nossa análise global dos escores prognósticos clássicos e na avaliação de sobrevida, pois o número reduzido de casos não afetaria nossas conclusões, além de que a análise comparativa de sobrevida também não mostrou diferenças entre os pacientes com MFP e MF-PV e MF-TE, como demonstrado na figura 9 em “resultados”.

Demonstramos que também na nossa população de pacientes com MF que os escores que incorporam dados citogenéticos e moleculares são mais acurados do que os escores que não o utilizam, conforme já discutido. No *guideline* brasileiro de NMPs da Associação Médica Brasileira, publicado há dois anos, é recomendado o uso do IPSS, DIPSS e DIPSS *plus* em todos os casos, e utilizando-se todos quando possível.(99) As recomendações do consórcio *LeukemiaNet*, publicado em 2018, também estipula estes três índices como os recomendados para todos os pacientes com MFP.(75) Em sua última publicação, o consenso do consórcio *LeukemiaNet* e Sociedade Europeia de Transplante de Medula Óssea recomenda a aplicação destes índices na avaliação e decisão antes da indicação do TMO-A.(100) São índices prognósticos bem fundamentados, com boa acurácia e pouco complexos, muito importantes na decisão terapêutica, mas que nem sempre são aplicados. Em um estudo com 491 pacientes realizado nos EUA, cerca de um terço dos pacientes com MFP não recebeu estratificação de risco. Nos dois terços que receberam, metade foi baseada em julgamento clínico, sem utilizar um sistema formal de estratificação,

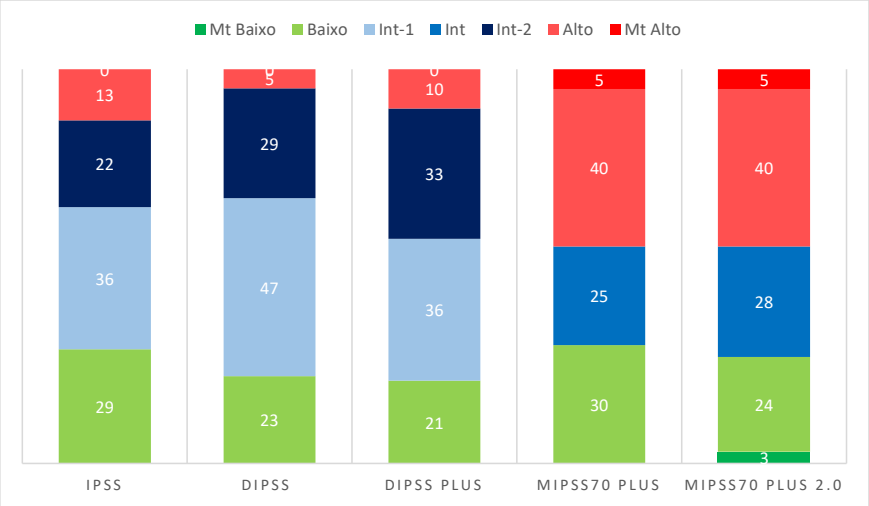
e não apresentaram acurácia em 40% dos casos, estando a classificação de risco subestimada em 85% deles.(101) Não sabemos a proporção de pacientes brasileiros onde esses escores são aplicados.

Em relação ao DIPSS *plus*, neste estudo pudemos aplicá-lo em 190 (82,6%) de 230 casos. Essa proporção seria menor (64,8%) se fossem utilizados apenas os resultados de CMO, pois em 23,5% dos casos o CMO não foi solicitado, e em 11,7% do total de pacientes não houve crescimento de metáfases adequadas para análise, mesmo se tratando de uma população de pacientes com MF atendida em centros de referência e por formadores de opinião. Uma avaliação de mundo real quanto a aplicação dos vários escores na nossa população e de percentagem de CMO disponíveis seria bastante útil para termos uma melhor apreciação da nossa realidade.

Finalmente, conforme já discutido, demonstramos também na nossa população que os índices prognósticos modernos usando dados mutacionais oferecem uma acurácia maior quando comparados aos índices clássicos, os quais vêm sendo cada vez mais incorporados às recomendações internacionais.(13, 38, 39)

Em resumo, os escores dinâmicos permitem que os pacientes sejam avaliados a qualquer momento da doença, o que é extremamente importante, uma vez que se trata de uma doença com evolução progressiva, com mudanças clínicas importantes ao longo do tempo e com aquisição de alterações mutacionais e cariotípicas durante sua evolução.(22, 23, 102) Os escores contendo informações cariotípicas e genéticas são capazes de definir o prognóstico de maneira mais acurada, auxiliando imensamente a decisão terapêutica dos pacientes com MF, em especial aqueles que são candidatos a TMO-A.(13, 39) Na nossa população pudemos observar essas diferenças entre os escores, com a maioria dos dados comparáveis à literatura, em especial em relação aos escores dinâmicos. A diferença prognóstica de nossos pacientes com MF em relação aos vários escores está resumida no gráfico10:

Gráfico 10 - Comparação entre os escores IPSS, DIPSS, DIPSS *plus*, MIPSS70 *plus* e MIPSS70 *plus* 2.0 em 230 pacientes com MF



O tratamento medicamentoso da MF sofreu grandes avanços com o advento dos inibidores JAK2. O impacto sintomatológico e na qualidade de vida destes pacientes é sem precedentes, e os estudos sugerem que possa haver um impacto na sobrevida, em especial naqueles com doença mais avançada. (29, 78-80) Entretanto, a única terapia curativa para a MF ainda é o TMO-A, e sua indicação deve ser considerada em todos os casos que apresentem condições clínicas e que se encontrem em escores de risco avançado.(13, 38, 75, 99, 100) Entretanto, a decisão de se transplantar ou não pacientes com MF é delicada e complexa. Embora grandes avanços tenham sido observados nos últimos anos, os resultados ainda mostram uma mortalidade elevada e resultados de sobrevida ainda longe dos patamares obtidos pelo TMO-A em outras situações. Num estudo retrospetivo envolvendo 289 pacientes com MFP submetidos a TMO-A entre 1989 e 2002, com uma média de idade de 47 anos, a mortalidade nos 100 dias foi de 18%, 35% e 19% e a sobrevida global em cinco anos foi de 37%, 30% e 40% para doadores familiares HLA idênticos, doadores não relacionados e doadores relacionados alternativos, respetivamente. O uso de condicionamento

de intensidade reduzida não mostrou benefício neste estudo.(34) Num outro estudo retrospetivo com 233 pacientes com MF transplantados entre 1990 e 2014, a sobrevida em 5 anos foi melhor, de 53%, sendo que o regime de condicionamento não se mostrou preditor de sobrevida na análise multivariada.(103) Num estudo mais recente e envolvendo 2224 pacientes transplantados entre 2000 e 2014, sendo 781 submetidos a regime de condicionamento ablativo e 1443 a condicionamento de regime reduzido, não houve diferença entre mortalidade não relacionada a recaída da doença em 5 anos ou na sobrevida global em 5 anos com relação ao tipo de condicionamento, sendo estas respetivamente de 35% e 53% para regime de condicionamento ablativo e 34% e 51% para regime de condicionamento reduzido.(35). Estes estudos, quando avaliados conjuntamente, sugerem uma melhora progressiva dos resultados do TMO-A em MF com o passar dos anos, mesmo que não estejam relacionados a regimes de condicionamento, mas ainda se faz necessário obter melhores resultados para que o TMO-A seja oferecido a um maior número de pacientes, em especial aqueles classificados como de baixo risco.

Já está demonstrado de que os índices prognósticos DIPSS e DIPSS *plus* têm um claro significado na prognosticação de pacientes com MF submetidos a TMO-A. Num estudo retrospetivo comparativo com 438 pacientes menores de 65 anos submetidos a TMO-A (190 casos) e terapia convencional (248 casos), o risco relativo de morte dos pacientes transplantados contra os não transplantados foi de 1,6 (CI 95%, 0,79 – 3,2; p=0.19) para pacientes com DIPSS de baixo risco, enquanto que para pacientes de DIPSS risco intermediário 2 foi de 0,55 (CI 95%, 0,36 – 0,83; p=o,005) e para os com DIPSS alto risco foi de 0,37 (CI 95%, 0,21 – 0,66; p=0.007). (104) Por outro lado, num outro estudo retrospetivo com 233 pacientes com MF transplantados com idade média de 54 anos, se observou que a sobrevida global, percentagem de recaída e sobrevida livre de recaída foi respetivamente de 78%, 5% e 20% para pacientes com DIPSS *plus* riscos baixo/intermediário 1 e 35%, 28% e 40% para pacientes com DIPSS *plus* intermediário 2 e alto risco. Ainda, o índice de recaída foi maior em pacientes mais idosos (RR=3,02, p=0.0007), sugerindo assim que melhores resultados são obtidos em pacientes mais jovens e menos graves.(103)

Embora os dados ainda sejam escassos, os escores mutacionais também têm sido capazes de fornecer informações relativas ao prognóstico em relação aos desfechos do TMO-A. Um estudo retrospetivo envolvendo 110 pacientes com MFP que foram condicionados fludarabina e melfalano (Flu/Mel) e submetidos a TMO-A não mostrou o impacto isolado das mutações *CALR*, *ASXL1*, *IDH1/2*, presença de uma ou mais HMR ou de serem TNs no desfecho dos transplantes. Neste estudo o escore DIPSS também não foi preditivo em relação a esses resultados. Entretanto, tanto o MIPSS70 como o MIPSS70 *plus* 2.0 foram capazes de predizer tanto a sobrevida global como a sobrevida livre de doença. Pacientes com MIPSS70 de alto risco pareceram ter uma sobrevida global pior daqueles com risco intermediário (RR 0,49; p=039), e aqueles com MIPPSS70 *plus* 2.0 de risco intermediário foram melhores do que aqueles classificados como de alto risco (RR, 0,29; p < 0,001), e os de alto risco melhores do que os classificados como de muito alto risco (RR, 5,05; p < 0,001).(105) Uma avaliação de 169 pacientes com MFP, MF-PV e MF-TE com idade média de 58 anos, condicionados com bussulfano e fludarabina e submetidos a TMO-A, mostrou que as mutações *CARL* foram um fator independente para uma menor mortalidade não relacionada à recaída, melhor progressão livre de doença e melhor sobrevida global, enquanto as mutações *ASXL1* e *IDH1* foram relacionadas com uma piora na sobrevida global e sobrevida livre de doença. Os pacientes TNs não tiveram um desfecho pior.(106)

Recentemente o Grupo Brasileiro de Transplante de Medula Óssea atualizou os dados sobre o TMO-A para MF, através de uma análise retrospetiva de 94 pacientes que foram submetidos a TMO-A de 1997 a 2020 em seis centros brasileiros. A idade média foi de 50 anos (4 – 70 anos), com estratificação pelo DIPSS como de baixo risco em 4 (4%) pacientes, risco intermediário 1 em 16 (17%), risco intermediário 2 em 47 (50%), e alto risco em 18 (19%). Em 49 (52%) dos casos foi utilizado o regime de condicionamento ablativo, e em 45 (48%) o regime de condicionamento de intensidade reduzida. Entre outros achados, o escore de DIPSS de alto risco foi relacionado a uma maior mortalidade (p=0.0028).(107) Embora ainda não tenhamos dados concretos que possam informar quantos pacientes com MF no Brasil não são transplantados por falta de vagas, doadores ou até mesmo por uma menor indicação médica de TMO-A,

e de que este levantamento abrange a maioria mas não a totalidade dos centros transplantadores do país, este parece ser um número bastante reduzido de procedimentos em MF, levando-se em consideração a incidência da doença, a população do nosso país, a quantidade de pacientes abaixo de 70 anos e a proporção de casos de IPSS / DIPSS de risco intermediário 2 e alto risco que encontramos em nossa avaliação.

O número de transplantes de medula na américa latina vem progressivamente crescendo ao longo dos anos, e o Brasil é o responsável pelo maior número desses procedimentos.(108) De 2009 a 2012 foi registrado um aumento de 30% no número de transplantes na américa latina.(109) Entretanto, temos uma desproporção significativa da razão entre transplantes autólogos em relação a transplantes alogênicos quando comparamos estes índices com outras regiões do mundo, como a américa do norte. Em 2012 essa razão foi de aproximadamente 1:1, enquanto na América do Norte esta razão era de 1:3. Em termos de doença a ser transplantada, a maioria dos casos de transplante autólogo foi para mieloma múltiplo e a segunda foi para linfomas, e a primeira indicação de TMO-A foi para leucemias, aqui sim em concordância com as indicações norte-americanas; entretanto a proporção de TMO-A tendo como indicação falências medulares na américa latina foi muito maior do que a observada lá, 25% contra 3.(108) As dificuldades de transplante de medula óssea em nosso meio vão desde a disponibilidade de leitos, condições de arcar com os custos do procedimento, número de profissionais capacitados, escassez de registros multicêntricos, acesso a saúde, desigualdade econômica, entre outros.(108, 110) Isso reforça a preocupação levantada pelos dados do Grupo Brasileiro, acima citadas. Assim, acreditamos que conhecer a nossa população de pacientes com MF e aplicar escores prognósticos com o maior número de informações possível, no maior número de casos possível, é crucial especialmente num país onde as condições de se oferecer e realizar o TMO-A são ainda mais difíceis.

5.5 Análise de sobrevida

A sobrevida média global da população estudada foi de 8,1 anos, (CI: 95%, 7,2 – 10,7 anos), com um seguimento médios de 5,3 anos (4,6 – 5,9) anos). A sobrevida estimada em 5 anos foi de 61% (53 – 70%).

Esta sobrevida global é superior em 2 anos a encontrada em um levantamento de 1004 pacientes com NMPs (428 casos com MF) da Clínica Mayo, com idade média de 63 anos (14 – 87), a maioria seguida até o falecimento, onde a sobrevida média foi de 5,9 anos. Também foi superior a encontrada num estudo com 428 pacientes da Clínica Mayo e de instituições italianas, onde a sobrevida média foi de 5,9 anos (CI 95%, 3,5 – 5,7 anos).(19) No estudo que definiu o IPSS, com 1054 pacientes de 7 instituições distintas na Europa e Clínica Mayo, a sobrevida média foi de 5,75 anos (CI 95%, 5,1 – 6,3 anos).(20)

No Brasil outros dados de sobrevida na MF são escassos. Um estudo publicado em 2008 no HC-USP com 40 pacientes com MF, com idade média de 62 anos, encontrou uma sobrevida média de 9,6 anos (CI: 95%, 2,9 – 16,3 anos).(64) O escore de risco utilizado foi o de Lille. (40) Um estudo realizado com 723 pacientes com MF oriundos de três instituições, sendo uma delas brasileira, a sobrevida média estimada para três anos foi de 56,5% (CI 95%, 52.1 – 61.3%). Entretanto, a sobrevida da coorte de 76 pacientes brasileiros não foi especificada.(54)

Os fatores que se mostraram estatisticamente positivos para sobrevida na análise univariada foram nível de hemoglobina, contagem de leucócitos, positividade para a mutação *SRSF2*, TNs, necessidade transfusional, a estratificação pelo escore IPSS, e de maneira menos significativa idade, gênero masculino, tamanho do baço, os escores DIPSS, DIPSS *plus* e MIPSS70 na categoria de alto risco e MIPSS70 *plus* na categoria de alto risco, (vide tabela 17 em “resultados”).

Para análise multivariada, foram estudados os fatores gênero masculino, tamanho do baço, positividade da mutação *SRSF2*, TNs, e estratificação pelo IPSS. Os fatores idade, hemoglobina e leucócitos já estavam contidos dentro do

escore IPSS. A necessidade transfusional está relacionada a queda da hemoglobina, que por sua vez se encontra dentro dos índices prognósticos, além de ter mostrado uma clara associação aos pacientes TNs, que já foram abordados na análise multivariada. Os índices DIPSS e DIPSS *plus* contém informações muito semelhantes as encontradas no IPSS, e houve ausência de eventos nos pacientes de baixo risco de ambos os índices. Os escores MIPSS70 e MIPSS70 *plus* não mostraram, à curva de sobrevida, uma estratificação clara. Assim, foram estudados na análise multivariada o género, tamanho de baço, positividade para mutação *SRSF2*, TNs, e o IPSS. Continuaram apresentando significância estatística relacionada a sobrevida na análise multivariada a condição de ser TN e a estratificação pelo IPSS. A análise multivariada está demonstrada na tabela 18 e na figura 2, em "resultados".

Embora na análise univariada "gênero masculino" tenha sido relacionado com sobrevida menor (RR, 1,8; 1,13 – 2,86, p=0,013), o fato de não ter continuado como fator de risco à análise multivariada (RR, 1,3; 0,72 – 2,3, p=0,39) não causou estranheza. Alguns escores encontraram o gênero masculino como fator de risco à análise inicial.(20) Entretanto, nenhum escore desenvolvido para pacientes com MF até hoje identificou o gênero como fator de risco em suas conclusões finais.(20-23, 33, 40, 51) No MIPSS70 *plus* 2.0 a estratificação do nível de hemoglobina é feita pelo gênero, sendo os níveis de corte de hemoglobina encontrados para homens mais elevados do que mulheres, mas o gênero não teve outro papel na definição prognóstica.(50)

Tamanho do baço se mostrou como fator de risco na análise univariada (RR, 1,03; 1,01 – 1,06, p=0,027), mas não permaneceu como fator de risco à análise multivariada (RR, 1,01; 0,97 – 1,05, p=0,72). É sabido que o tamanho do baço está associado a uma maior carga tumoral na MF.(57) Também tem se observado que a redução do baço em pacientes tratados com ruxolitinibe pode estar correlacionada com uma maior sobrevida global, uma sobrevida livre de progressão e uma maior sobrevida livre de eventos.(111) Algumas evidências sugerem que o tamanho do baço tenha correlação com desfechos em pacientes com MF submetidos a TMO-A.(112) Entretanto, nenhum escore foi capaz de identificar o tamanho do baço como fator de risco para sobrevida.(20-23, 33, 50)

Os pacientes dependentes de transfusão tiveram uma sobrevida menor segundo a análise univariada (RR, 3,42; 2,15 – 5,44, p<0,0001). Este fator está ligado a queda de hemoglobina, que por sua vez está inclusa nos escores prognósticos e na nossa análise com os pacientes TNs, mais dependentes de transfusão à nossa análise (p=0.003). A necessidade transfusional foi identificada pela primeira vez como fator de risco em escore prognóstico pelo DIPSS *plus*, onde se mostrou como fator de risco independente das variáveis do DIPSS.(22) Em uma avaliação de 254 pacientes com MFP da Clínica Mayo, publicada em 2009, se notou que a necessidade transfusional era um fator de risco independente do IPSS e do CMO. A necessidade transfusional neste estudo foi definida como histórico de necessidade de transfusão, independente do volume, com uma hemoglobina menor que 8,5 g/dL. (45) Este critério foi estudado e finalmente incorporado ao DIPSS *plus*.(22) Ele se mostrou novamente estatisticamente significativo como fator de risco independente em uma análise com 100 pacientes com MFP seguidos na Clínica Mayo.(18) Embora seja uma variável importante na avaliação de pacientes com MFP pela classificação de risco do DIPSS *plus*, a necessidade transfusional acabou não sendo incorporada pelos escores mutacionais.(23, 50)

A positividade para a mutação *SRSF2* se mostrou associada à sobrevida na análise univariada (RR, 5,95; 2,5 – 14,2, p < 0,0001), conforme também está demonstrado na curva de sobrevida comparativa ilustrada pela figura 3, em “resultados”. Entretanto, na análise multivariada essa correlação não se mostrou mais significativa (RR, 1,5; 9,53 – 4, p=0,46). A mutação *SRSF2* é uma das mutações definidas como HMR, e compõe todos os escores moleculares modernos para MFP. Entretanto, estas mutações não têm um impacto prognóstico isoladamente, tendo que estar inseridas em um contexto clínico e molecular para exercer essa influência.(23, 26, 50, 51) Por sua vez, dentre todas as mutações analisadas por nosso estudo, foi a que se mostrou ter uma correlação estatística mais próxima (p=0.06) com os casos TNs, e provavelmente seu impacto está ligado a este grupo de pacientes, na nossa avaliação.

Os pacientes TNs apresentaram uma sobrevida menor em relação aos pacientes não-TNs nas análises univariada (RR, 2,95; 1,63 – 5,33, p=0,00036) e multivariada (RR, 2,7; 1,43 – 5,1, p=0,002), com uma sobrevida estimada de 4,9 anos, e uma probabilidade de estar vivo em 6 anos de 43%, enquanto os não TN apresentaram uma sobrevida média de 9,8 anos, com uma probabilidade de estarem vivos em 6 anos de 67% (p=0,0002), conforme tabelas 17 e 18 e figura 10 em "resultados". Como já relatado, estes pacientes apresentaram uma necessidade transfusional significativamente maior e uma tendência a apresentarem mais mutações *SRSF2*, quando comparados aos não TNs, e provavelmente estes fatores tiveram influência na pior sobrevida. Estas correlações estão demonstradas na tabela 5 em "resultados".

Os pacientes com MF TNs correspondem a aproximadamente 10% dos casos de MF e têm sido associados a uma sobrevida global e uma sobrevida livre de leucemia piores.(25, 74) Entretanto, na coorte de 709 pacientes da Clínica Mayo do estudo da aliança Mayo-Careggi, onde 38 (5,3%) eram TNs, foi encontrada uma menor sobrevida global e sobrevida livre de leucemia na análise univariada, mas não na análise multivariada. Já na coorte de pacientes do grupo italiano do mesmo estudo, com 68 (17,6%) pacientes TNs de um total de 386 pacientes, houve impacto na sobrevida.(84)

Pacientes TNs não tiveram um prognóstico pior ao TMO-A num estudo de 169 pacientes com MF, embora aqueles pacientes *CALR* positivos tiveram melhores resultados.(106) No estudo brasileiro que avaliou 140 pacientes com MFP em relação a sua condição mutacional diretora, sendo 13 (9,3%) TNs, não foi avaliada a sobrevida ou outros desfechos.(69) Em um outro estudo com 51 pacientes com MFP, 1 era TN, e neste a sobrevida global foi menor (p=0,002).(70)

Assim, novamente ressaltamos a importância de estudarmos e identificarmos cuidadosamente nossos pacientes com MF TNs, pois além das dificuldades propedêuticas que possuímos na prática clínica do nosso país, também temos uma disponibilidade limitada das opções terapêuticas, e nossa população se mostrou com uma mortalidade significativamente aumentada.

A estratificação pelo IPSS manteve-se como fator de risco para sobrevida na análise univariada e multivariada em toda sua estratificação, corroborando em nossa população os dados encontrados pelo estudo original e por outros estudos.(20-22) As curvas de sobrevida do nosso estudo está representada na figura 4 em “resultados”. Um estudo nacional com 74 pacientes, com idade média de 71,5 anos (31 – 92 anos), agrupando os pacientes nos escores intermediário 2 e alto contra pacientes agrupados nos escores baixo e intermediário 1 mostrou também uma diferença significativa de sobrevida, embora menos evidente do que a nossa (p=0,02).(41) Um estudo associou a sobrevida ao escore de Lille, e outro ao padrão das mutações diretoras.(64, 70)

Os escore de DIPSS também se mostrou significativo em relação a sobrevida na análise multivariada, confirmando em nossa população seu papel prognóstico, conforme previamente descrito em outros estudos.(21, 22) As curvas de sobrevida estão representadas na figura 5, em “resultados”.

Em relação ao DIPSS *plus*, foi observada uma diferença na sobrevida nos 4 grupos de risco, mas de maneira menos evidente do que nos escores anteriores. O escore contou com um número menor de pacientes e contou com alguns CMO não confirmados por nossa análise, o que pode justificar essa diferença. Em 4 casos onde o cariótipo de CMO era normal o CSP se mostrou alterado e mudando a classificação prognóstica, e é possível que isso viesse a ocorrer em outras situações. De qualquer maneira, nosso estudo corroborou os dados do estudo original.(22) Mostrou também que é um escore aplicável em nossa população, com capacidade de estimar a sobrevida de nossos pacientes de maneira adequada. As curvas de sobrevida estratificada para os escores de risco são mostradas na figura 6, em “resultados”.

Em relação aos escores MIPSS70 e MIPSS70 *plus,* pudemos observar que um impacto na sobrevida do grupo de alto risco do MIPSS70 e riscos alto e muito alto do MIPSS70 *plus*, mas não no subgrupo intermediário, confirmando parcialmente os dados encontrados no estudo utilizado para o desenvolvimento dos escores.(23, 50) Estudamos aqui um número menor de casos, 65% do total de 230 pacientes, e identificamos um percentual de mutações *SRSF2* menor do que o descrito, sendo possível que estes fatores não tenham permitido uma

melhor estratificação dos grupos intermediário, e com a esperada correlação de sobrevida na nossa população. As curvas de sobrevida estão ilustradas nas figuras 7 e 8, em “resultados”.

A análise de sobrevida comparando pacientes que estavam usando ruxolitinibe e não estavam não mostrou impacto estatístico. O número de pacientes (38 casos) que estavam utilizando a medicação era muito pequeno em relação a população estudada (230 casos), e sabemos que muitos não faziam o seu uso continuamente por problemas de distribuição do medicamento no SUS. Esta curva de sobrevida está mostrada na figura 9, em “resultados”. O impacto na sobrevida do ruxolitinibe foi sugerido pelos estudos originais usados para aprovação (COMFORT 1 e COMFORT 2), assim como a análise combinada de ambos.(78-80) Evidências de mundo real nos EUA sugerem que a sobrevida dos pacientes com MF aumentou após a aprovação do ruxolitinibe no país.(101) O impacto na redução do baço e na sintomatologia do ruxolitinibe foi estudada na coorte de 104 pacientes brasileiros que participaram do estudo de extensão JUMP, mas a sobrevida não foi analisada.(77) Este estudo foi o primeiro com pacientes brasileiros encontrados em estudos clínicos publicados e indexados a avaliar se a medicação teve um impacto na sua sobrevida. Por motivos éticos e econômicos, é improvável que novos estudos randomizados comparando o ruxolitinibe com placebo ou melhor terapia disponível, tendo como objetivo principal avaliação de sobrevida, venham a ser realizados. Acreditamos assim que outros estudos de mundo real, envolvendo um maior número de pacientes brasileiros utilizando a medicação de maneira regular, poderia trazer mais respostas em relação a este efeito do medicamento em nossa população e em geral.

6. CONCLUSÕES

Estudamos e caracterizamos do ponto de vista clínico, citogenético e molecular 230 pacientes com MFP e MF-PV e MF-TE, recrutados em 8 centos de referência no Brasil, sendo o maior estudo brasileiro até a presente data em número de pacientes e número de centros, fornecendo dados ainda não obtidos, nessa magnitude, em nossa população.

Aplicamos os escores clássicos e os mutacionais nesta população de pacientes com MFP e MF-PV e MF-TE, e os comparamos entre si. Observamos que em relação aos estudos originais, temos uma maior percentagem de pacientes menos graves quando utilizamos os escores clássicos, mas equivalentes a estes quando utilizamos os escores mutacionais. Também observamos as discrepâncias entre os vários escores se repete na nossa população, mesmo quando essa comparação se dá entre escores não mutacionais.

Encontramos como fatores de risco relacionados a sobrevida a estratificação prognóstica pelo IPSS e pacientes TNs, de acordo com o descrito anteriormente, mostrando que a acurácia no diagnóstico e na definição prognóstica de nossos pacientes também é fundamental em nosso meio.

Avaliamos o grau de obtenção de metáfases na coleta de CSP, e observamos que pacientes com contagem leucocitária mais elevada e com maior grau de fibrose têm uma taxa de maior de sucesso neste quesito. Observamos que o CMO proporcionou um aumento significativo na disponibilidade de dados para obtenção dos índices prognósticos baseados em dados citogenéticos. Observamos também que os CSP apresentaram uma boa correlação com os CMO anteriormente obtidos, e que o CSP pode ser utilizado na MF na ausência do CMO e/ou durante seguimento destes pacientes para estratificação prognóstica.

Como estudos futuros, um registo nacional centralizado dos pacientes portadores de MFP e MF-PV e MF-TE seria fundamental para uma maior

compreensão dessa população de pacientes, com um evidente impacto direto sobre sua assistência.

Levantamentos nacionais envolvendo a classe médica sobre a aplicação dos escores prognósticos proporcionariam um panorama de como esses esses pacientes têm sido avaliados, auxiliando no planejamento de projetos de orientação e educação médica continuada quanto a esse tópico.

A pesquisa de painéis genéticos mais extensos e em um número maior de pacientes poderia revelar mais detalhes sobre as características mutacionais de nossos pacientes e possível desenvolvimento de escores adaptados à nossa população.

Estudos com coleta simultânea e análise centralizada de CMO e CSP em pacientes com MF poderiam confirmar os dados encontrados e avaliar de maneira ainda mais acurada o papel do CSP nesta situação.

ANEXO 1

Critérios Diagnósticos OMS 2016 – MIELOFIBROSE PRIMÁRIA (MFP) (12)

São necessários estarem presentes TODOS os critérios maiores e pelo menos UM critério menor confirmado em duas determinações consecutivas

Critérios Maiores

1. Presença de proliferação megacariocítica com atipia acompanhada por fibrose retículínica e/ou colagênica, graus 2 e 3.
2. Não preencher critério da OMS para ET, PV, LMC BCR-ABL +, SMD, ou outras neoplasias mieloides
3. Presença da mutação JAK2, CARL ou MPL, ou na ausência dessas mutações, presença de outros marcadores clonais *, ou ausência de evidências de fibrose medular reacional **.

Critérios Menores

1. Anemia não atribuída a outra comorbidade
2. Leucocitose acima de 11 x 10^9/L
3. Esplenomegalia Palpável
4. Aumento de DH acima do limite normal da referência do exame
5. Leucoeritroblastose

* na ausência de uma das 3 mutações, a procura das outras mutações mais frequentes (ex. *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SF3B1*) é útil para se determinar a natureza clonal da doença

** Fibrose medular secundária a infecção, desordem autoimune, outras condições inflamatórias crônicas, tricoleucemia ou outras neoplasias linfoides, doença metastática maligna, ou mielopatias tóxicas (crônicas)

Critérios Diagnósticos da OMS 2016 – MIELOFIBROSE PRIMÁRIA PRÉFIBRÓTICA (pre-MFP) (12)

São necessários estarem presentes TODOS os critérios maiores e pelo menos UM critério menor confirmado em duas determinações consecutivas

Critérios Maiores

4. Presença de proliferação megacariocítica com atipia sem fibrose retículínica > 1, acompanhada por aumento da celularidade de medula óssea ajustada para a idade, proliferação granulocítica e frequentemente eritropoiese diminuída.
5. Não preencher critério da OMS para ET, PV, LMC *BCR-ABL* +, SMD, ou outras neoplasias mieloides
6. Presença da mutação JAK2, CARL ou MPL, ou na ausência dessas mutações, presença de outros marcadores clonais *, ou ausência de evidências de fibrose medular reacional **.

Critérios Menores

6. Anemia não atribuída a outra comorbidade
7. Leucocitose acima de 11 x 10^9/L
8. Esplenomegalia Palpável
9. Aumento de DH acima do limite normal da referência do exame

* na ausência de uma das 3 mutações, a procura das outras mutações mais frequentes (ex. ASXL1, EZH2, TET2, IDH 1/2, SRSF2, SF3B1) é útil para se determinar a natureza clonal da doença

** Fibrose medular secundária a infecção, desordem autoimune, outras condições inflamatórias crônicas, tricoleucemia ou outras neoplasias linfoides, doença metastática maligna, ou mielopatias tóxicas (crônicas)

Critérios Diagnósticos do IWG-MRT - MIELOFIBROSE SECUNDÁRIA A POLICITEMIA VERA (MF-PV) (32)

São necessários estarem presentes TODOS os critérios maiores e pelo menos DOIS critério menores

Critérios Maiores

1. Documentação de diagnóstico prévio de Policitemia Vera pelos critérios da OMS – 2008
2. Fibrose Medular 2 a 3 (escala de 0 a 3) ou 3 a 4 (escala de 0 a 4)

Critérios Menores

1. Anemia ou perda sustentada de necessidade de flebotomia (na ausência de terapia citorredutora) ou de terapia citorredutora para eritrocitose
2. Reação leucoeritroblástica em sangue periférico
3. Esplenomegalia progressiva definida como um aumento no baço palpável em 5 cm ou aparecimento de baço palpável onde previamente não palpável
4. Desenvolvimento de um ou mais sintomas constitucionais (febre inexplicada >= 37.5ºC, perda de > 10% do peso em 6 meses, sudorese profusa)

Critérios Diagnósticos do IWG-MRT - MIELOFIBROSE SECUNDÁRIA A TROMBOCITEMIA ESSENCIAL (32)

São necessários estarem presentes TODOS os critérios maiores e pelo menos DOIS critério menores

Critérios Maiores

1. Documentação de diagnóstico prévio de Trombocitemia Essencial pelos critérios da OMS – 2008
2. Fibrose Medular 2 a 3 (escala de 0 a 3) ou 3 a 4 (escala de 0 a 4)

Critérios Menores

1. Anemia com uma diminuição de >= 2 g/dL do nível basal de hemoglobina
2. Reação leucoeritroblástica em sangue periférico
3. Esplenomegalia progressiva definida como um aumento no baço palpável em 5 cm ou aparecimento de baço palpável onde previamente não palpável
4. Aumento do DHL (acima do limite superior do método utilizado)
5. Desenvolvimento de um ou mais sintomas constitucionais (febre inexplicada >= 37.5ºC, perda de > 10% do peso em 6 meses, sudorese profusa)

ANEXO 2

Questionário

1. Iniciais: _____ Número do centro: _____
2. Número de identificação do paciente para o estudo: _____
3. Data do preenchimento deste questionário: __/__/__
4. Data de nascimento: __/__/__
5. Idade: _____
6. Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino
7. Etnia: ( ) Caucasiano ( ) Negro ( ) Pardo ( ) Oriental ( ) Índio ( ) Outro _____
8. Estado civil: ( ) Casado ( ) Solteiro ( ) União Estável ( ) Viúvo ( ) Divorciado
9. Instituição de origem: _____
10. Cidade de moradia: _____ Estado:_____
11. Renda familiar média aproximada: _____ salários mínimos
12. Histórico familiar (será definido como a presença em parentes de primeiro ou segundo grau de Mielofibrose Primária): _____
13. Exposição profissional (informe exposição que possa estar relacionada com a doença): _____
14. Sintomas iniciais: _____
15. Idade no início dos sintomas: _____

16. Hemograma atual:

    1. Data do exame: ___/___/___
    2. Hb:___, Ht:____, VCM:____, GB: _____, Bl:___,PM:___, Mielo:___, Meta:___, Bast:___, Seg:___, Eos:___, Bas:___, Linf:___,Mon:___, Plasm:___, Plaquetas:___

17. DHL atual:_____ - Limite superior do método:_____

18. Tamanho do Baço:_____

19. Tipo de mielofibrose

    ( ) MIELOFIBROSE PRIMÁRIA
    ( ) MIELOFIBROSE SECUNDÁRIA A POLICITEMIA VERA
    ( ) MIELOFIBROSE SECUNDÁRIA A TROMBOCITEMIA ESSENCIAL

20. IPSS na época do diagnostico:

	Não	Sim	
> 65 anos de idade	0	1	pontos
Presença de sintomas constitucionais (perda de peso, febre > 37,5°C, sudorese noturna);	0	1	pontos
Hb < 10g/dL	0	1	pontos
Contagem de leucócitos >25 × 10^9/L	0	1	pontos
Blastos circulantes ≥1%	0	1	pontos

Baixo	**Intermediário 1**	**Intermediário 2**	**Alto**	**Resultado**
0 pontos	1 ponto	2 pontos	3 a 5 pontos	

( ) IPSS não disponível

21. DIPSS atual

	Não	Sim	
> 65 anos de idade	0	1	pontos
Presença de sintomas constitucionais (perda de peso, febre > 37,5°C, sudorese noturna);	0	1	pontos
Hb < 10g/dL	0	2	pontos
Contagem de leucócitos >25 × 10^9/L	0	1	pontos
Blastos circulantes ≥1%	0	1	pontos

Baixo	**Intermediário 1**	**Intermediário 2**	**Alto**	**Resultado**
0 pontos	1 a 2 pontos	3 a 4 pontos	5 pontos	

( ) DIPSS não disponível

22. DIPSS *plus* atual

	Não	Sim	
DIPPS intermediário 1	0	1	pontos
DIPPS intermediário 2	0	2	pontos
DIPPS intermediário 3	0	3	pontos
Cariótipo desfavorável *	0	1	pontos
Necessidade transfusional **	0	1	pontos
Contagem de plaquetas < 100 x 10^9/L	0	1	pontos

** - Cariótipo desfavorável: cariótipo complexo, ou uma a duas anormalidades incluindo +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p-, inv(3), ou rearranjo 11q23*

*** - Necessidade transfusional: anemia com necessidade transfusional no momento da avaliação ou histórico de mais de um episódio de necessidade transfusional não associada a hemorragia. Episódio transfusional isolado e único no passado não é considerado como necessidade transfusional.*

Baixo	**Intermediário 1**	**Intermediário 2**	**Alto**	**Resultado**
0 pontos	1 ponto	2 a 3 pontos	4 a 6 pontos	

( ) DIPSS *plus* não disponível

20. Biópsia de medula óssea (coletar todos os dados disponíveis de patologia de medula óssea):

20.1 Descrição:

_____

_____

_____

1.2. Grau de fibrose de medula óssea: _____

1.3. Data da biópsia de medula óssea: ____/____/____

21. Cariótipo de medula óssea:

21.1 Descrição:

_____

_____

_____

21.2 – Data da coleta do cariótipo ____/____/____

23. BCR-ABL: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Não Realizado

24. JAK2: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Não Realizado

25. Tratamentos já realizados para Mielofibrose:

Acompanhamento sem tratamento ( ) Sim ( ) Não

Eritropoietina: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Hidroxiureia: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Melfalan/Busulfan: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Terapia com corticoide: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Talidomida: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Interferon alfa: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Danazol / Andrógenos : ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Cirurgia (remoção do baço) : ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Irradiação esplênica: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Transplante de medula óssea: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Sangria: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Transfusão de sangue: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Transfusão de dependência (pelo menos 2 U de c. hemácias para um nível de Hb <8,5 g / dL não associado à hemorragia): ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Quelação de ferro: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Ácido acetil-salicílico: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Anagrelida: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Ruxolitinibe: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido

Estudo Clínico: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido - Caso positivo, qual?

_____

Outros: ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Desconhecido – Se positivo, qual(ais):

_____

_____

Tratamento atual para Mielofibrose: _____

26. Necessidade transfusional (pelo menos 2 unidades de concentrado de hemácias para um nível de Hb < 8.5g/dL não associado a hemorragia): ( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Sem dados suficientes

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntario(a), da pesquisa ***"Caracterização Clínica, Citogenética e Molecular de Pacientes Brasileiros com Mielofibrose Primária e Mielofibrose Pós-Policitemia Vera e Pós-Trombocitemia Essencial",*** pelo pesquisador responsável Dr. Renato Sampaio Tavares, Médico Hematologista do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFG.

Número do Protocolo:

Você foi diagnosticado com Mielofibrose Primária, que é uma doença rara e crônica que afeta a sua medula óssea. Consequentemente, o seu sangue também é acometido. A evolução dessa doença não é uniforme, afetando cada paciente de uma maneira diferente, algumas vezes de maneira mais agressiva, outras vezes de maneira mais lenta e suave. O comportamento da doença também muda com o passar do tempo.

Atualmente, médicos e investigadores no Brasil e no mundo procuram entender cada vez mais como a doença se comporta em cada paciente e procuram marcadores e sinais que possam ajudar nessa compreensão. Vários novos marcadores têm sido estudados, mas os dados ainda são escassos. No Brasil são raros os estudos sobre esse assunto. Os médicos precisam saber mais sobre as características dessa doença nos diferentes pacientes em diversas regiões do mundo, de forma que no futuro outros pacientes possam se beneficiar do conhecimento que será obtido através do registo desta informação.

Estamos pedindo que você forneça sua autorização, e se você concordar, seu médico irá coletar seus dados médicos disponíveis nos seus arquivos médicos e também através de um questionário para inclusão em um banco de dados central. Assim que todas as informações forem registadas, serão analisadas exclusivamente para os fins deste estudo, junto com dados de outros pacientes como você.

A identificação dessas mutações e alterações citogenéticas, bem como a coleta de seus dados, não irá acarretar em nenhum problema futuro para o(a) senhor(a) quanto ao tratamento em nosso serviço. O(A) senhor(a) será submetido(a) a uma coleta de aproximadamente 10 ml de sangue periférico

como é feito rotineiramente em suas visitas agendadas ao hospital. Como você já sabe, o desconforto é mínimo, sendo uma ou mais picadas para a retirada de sangue, onde pode haver o aparecimento de um hematoma após esta coleta, da mesma maneira como são colhidos os exames rotineiros que o(a) senhor(a) se submete com certa rotina. Pode ser necessária a coleta de mais de uma amostra, em dias diferentes, caso haja necessidade, e somente com sua autorização.

A sua participação neste estudo irá no auxiliar a compreender melhor a sua doença - Mielofibrose Primária - não só de uma maneira global, mas também identificar as variações regionais dos pacientes no Brasil. Essa compreensão e avaliação poderá auxiliar a tratar esses pacientes de uma maneira melhor e mais adequada no futuro, tanto com as terapias atualmente disponíveis como com novas terapias a virem a ser implementadas.

Garantimos ao senhor(a) que poderá ter acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para retirar eventuais dúvidas. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade do seu tratamento e acompanhamento médico. Não haverá despesas pessoais para o (a) Sr.(a) em nenhuma fase do estudo, incluindo exames e consultas. Sua participação será voluntária, não havendo nenhuma gratificação financeira ou pagamento.

Seus dados pessoais (nome, número de identificação, telefone, endereço) não serão incluídos no banco de dados. Apenas informações médicas, tais como dados sobre seu histórico médico, resultados do seu exame físico, exames realizados para o diagnóstico, tratamento(s) realizado(s), seu estado atual de saúde, e os resultados dos exames mais recentes, serão registados. Sua identidade permanecerá confidencial.

Após ser esclarecido(a) sobre a pesquisa e a sua participação como voluntario, e havendo uma confirmação livre e espontânea em aceitar a participar como voluntario(a), você deverá assinar todas as páginas e ao final deste documento, em duas vias, que deverão ser assinadas também pelo pesquisador que aplicar este termo. Uma das vias ficará com você e a outra via permanecerá com o pesquisador responsável.

Em caso de dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá procurar o pesquisador responsável pela pesquisa, Dr. Renato Sampaio Tavares, através dos telefones (62) 98146-9161.

Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 62-3269-8338 e/ou 62-3269-8426, e-mail: cephcufg@yahoo.com.br, ou no endereço: 1ª Avenida S/Nº Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar. Horário de funcionamento: 2ª a 6ª das 7:00 às 17:00h.

TERMO DE CONSENTIMENTO APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, _____, li e/ou ouvi a leitura dos esclarecimentos acima e compreendi para que serve o estudo ***"Caracterização Epidemiológica, Citogenética Molecular e Revisão Histológica de Pacientes Brasileiros com Mielofibrose Primária e Mielofibrose Pós-Policitemia Vera e Pós-Trombocitemia Essencial"***. Eu permito que meu médico colete minhas informações médicas relevantes para inclusão em um banco de dados. Eu concordo que meus dados médicos sejam registados, embora minha identidade seja mantida como estritamente confidencial, e que ninguém além de meu médico e sua equipe terá acesso a informações específicas sobre mim. Eu entendi que sou totalmente livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento, nem incorrerá em penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Concordo em participar do estudo.

Paciente

Nome: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

Testemunha:

Nome: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

(*Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual*).

Pesquisador que Aplicou o Termo:

Nome: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

ANEXO 4

- DIPSS *plus* após resultado do cariótipo de sangue periférico

Fatores de risco	**escore**
DIPSS int-1	1 ponto
DIPPS int-2	2 pontos
DIPPS Alto Risco	3 pontos
Plaquetopenia <100,000	1 ponto
Necessidade Transfusional *	1 ponto
Cariótipo Desfavorável **	1 ponto

** - Cariótipo desfavorável: cariótipo complexo, ou uma a duas anormalidades incluindo +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p-, inv(3), ou rearranjo 11q23*
*** - Necessidade transfusional: anemia com necessidade transfusional no momento da avaliação ou histórico de mais de um episódio de necessidade transfusional não associada a hemorragia.*

	Baixo	**Intermediário 1**	**Intermediário 2**	**Alto**
	0 pontos	1 ponto	2 a 3 pontos	4 a 6 pontos
Resultado	: _____			
	( ) DIPSS *plus* indisponível			

- Cariótipo de SANGUE PERIFÉRICO

- ( ) Não realizado ( ) Normal ( ) Alterado ( ) Sem crescimento
- Número de Metáfases: _____
- Data do resultado: **X**

ANEXO 5

- MIPSS 70

Fatores de risco	escore
Hemoglobina <10.0 g/dL	1 ponto
Sintomas Constitucionais	1 ponto
Fibrose Medular > 1	1 ponto
Blastos >= 2%	1 ponto
Leucocitose > 25.000/uL	2 pontos
Plaquetopenia < 100.000/uL	2 pontos
Uma Mutação de Alto Risco	1 ponto
Ausência Mutação *CALR* tipo 1	1 ponto
2 ou + Mutações de Alto Risco	2 pontos

- HRM = *ASXL1, EZH2, SRSF2, or IDH1/2*
  - *0 – 1 = Baixo*
  - *2 – 4 = Intermediário*
  - *5 ou + = Alto*

( ) Baixo ( ) Intermediário ( ) Alto ( ) ND

- MIPSS 70 *plus* com cariótipo de **Medula Óssea**

Fatores de risco	escore
Hemoglobina <10.0 g/dL	1 ponto
Sintomas Constitucionais	1 ponto
Blastos >= 2%	1 ponto
Uma Mutação de Alto Risco	1 ponto
Ausência Mutação *CALR* tipo 1	2 pontos
2 ou + Mutações de Alto Risco	2 pontos
Cariótipo Desfavorável	3 pontos

- *HRM = ASXL1, EZH2, SRSF2, or IDH1/2*
- *Unfavorable karyotype indicates* ***any abnormal karyotype other than*** *normal karyotype or sole abnormalities of 20q2, 13q2, +9, chromosome 1 translocation/duplication, 2Y, or sex chromosome abnormality other than 2Y*

  - *0 – 2 = Baixo*
  - *3 = Intermediário*
  - *4 a 6 = Alto*
  - *7 ou + = Muito Alto*

( ) Baixo ( ) Intermediário ( ) Alto ( ) Muito Alto ( ) ND

- **MIPSS 70 *plus* 2.0** com cariótipo de **Medula Óssea**

Fatores de risco	escore
Anemia Moderada	1 ponto
Anemia Severa	2 pontos
Sintomas Constitucionais	2 pontos
Blastos >= 2%	1 ponto
Uma Mutação de Alto Risco	2 pontos
Ausência Mutação *CALR* tipo 1	2 pontos
2 ou + Mutações de Alto Risco	3 pontos
Cariótipo Desfavorável	3 pontos
Cariótipo Muito Desfavorável	4 pontos

- *HRM = ASXL1, EZH2, SRSF2,r IDH1/2, U2AF1*
    - *0 – 1 = Baixo*
    - *2 – 4 = Intermediário*
    - *5 ou + = Alto*

( ) Baixo ( ) Intermediário ( ) Alto ( ) ND

- ✓ Anemia Moderada
    - ❑ Mulheres: 8 – 9.9 g/dL / Homens: 9 – 10,9 g/dL
- ✓ Anemia Severa
    - ❑ Mulheres: < 8,0 g/dL - Homens: < 9,0 g/dL
- ✓ Cariótipo - classficiação
    - ❑ Very high risk (VHR): single/multiple abnormalities of -7, inv(3), i(17q) or 12p
    - ❑ Provisional VHR category: sole autosomal trisomies other than +9 and +8 or single/multiple 11q-/11q23 abnormalities
    - ❑ Unfavorable risk category: sole abnormalities of +8 or 7q- or sole translocations not involving chromosome 1 or sole abnormalities not otherwise classified or monosomal karyotype without VHR abnormality or complex non-monosomal without VHR abnormality
    - ❑ Provisional unfavorable risk category: single/multiple 5q- abnormalities or two abnormalities without VHR abnormality
    - ❑ Favorable risk category: sole abnormalities of 20q-, 13q-, +9 or sole sex chromosome abnormalities including -Y or sole chromosome 1 translocations/duplications or normal karyotype

- **GIPSS** com cariótipo de **Medula Óssea**

Fatores de risco	escore
Mutação *ASXL1*	1 ponto
Mutação *SRSF2*	1 ponto
Mutação *U2AF1Q157*	1 ponto
Ausência Mutação *CALR* tipo 1	1 ponto
Cariótipo Desfavorável	1 ponto
Cariótipo Muito Desfavorável	2 pontos

- *0 = Baixo*
- *1 = Intermediário 1*
- *2 = Intermediário 2*
- *3 ou + = Alto*

( ) Baixo ( ) Intermediário 1 ( ) Intermediário 2 ( ) Alto ( ) ND

- **MIPSS 70 *plus*** com cariótipo de **Sangue Periférico**

Fatores de risco	escore
Hemoglobina <10.0 g/dL	1 ponto
Sintomas Constitucionais	1 ponto
Blastos >= 2%	1 ponto
Uma Mutação de Alto Risco	1 ponto
Ausência Mutação *CALR* tipo 1	2 pontos
2 ou + Mutações de Alto Risco	2 pontos
Cariótipo Desfavorável	3 pontos

- HRM = *ASXL1, EZH2, SRSF2, or IDH1/2*
- *Unfavorable karyotype indicates **any abnormal karyotype other than** normal karyotype or sole abnormalities of 20q2, 13q2, +9, chromosome 1 translocation/duplication, 2Y, or sex chromosome abnormality other than 2Y*

- *0 – 2 = Baixo*
- *3 = Intermediário*
- *4 a 6 = Alto*
- *7 ou + = Muito Alto*

( ) Baixo ( ) Intermediário ( ) Alto ( ) Muito Alto ( ) ND

- **MIPSS 70 *plus* 2.0** com cariótipo de **Sangue Periférico**

Fatores de risco	escore
Anemia Moderada	1 ponto
Anemia Severa	2 pontos
Sintomas Constitucionais	2 pontos
Blastos >= 2%	1 ponto
Uma Mutação de Alto Risco	2 pontos
Ausência Mutação *CALR* tipo 1	2 pontos
2 ou + Mutações de Alto Risco	3 pontos
Cariótipo Desfavorável	3 pontos
Cariótipo Muito Desfavorável	4 pontos

- HRM = *ASXL1, EZH2, SRSF2,r IDH1/2, U2AF1*

  - *0 – 1 = Baixo*
  - *2 – 4 = Intermediário*
  - *5 ou + = Alto*

( ) Baixo ( ) Intermediário ( ) Alto ( ) ND

- ✓ Anemia Moderada
  - ❑ Mulheres: 8 – 9.9 g/dL / Homens: 9 – 10,9 g/dL
- ✓ Anemia Severa
  - ❑ Mulheres: < 8,0 g/dL - Homens: < 9,0 g/dL
- ✓ Cariótipo - classficiação
  - ❑ Very high risk (VHR): single/multiple abnormalities of -7, inv(3), i(17q) or 12p
  - ❑ Provisional VHR category: sole autosomal trisomies other than +9 and +8 or single/multiple 11q-/11q23 abnormalities
  - ❑ Unfavorable risk category: sole abnormalities of +8 or 7q- or sole translocations not involving chromosome 1 or sole abnormalities not otherwise classified or monosomal karyotype without VHR abnormality or complex non-monosomal without VHR abnormality
  - ❑ Provisional unfavorable risk category: single/multiple 5q- abnormalities or two abnormalities without VHR abnormality
  - ❑ Favorable risk category: sole abnormalities of 20q-, 13q-, +9 or sole sex chromosome abnormalities including -Y or sole chromosome 1 translocations/duplications or normal karyotype

- **GIPSS** com cariótipo de **Sangue Periférico**

Fatores de risco	escore
Mutação *ASXL1*	1 ponto
Mutação *SRSF2*	1 ponto
Mutação *U2AF1Q157*	1 ponto
Ausência Mutação *CALR* tipo 1	1 ponto
Cariótipo Desfavorável	1 ponto
Cariótipo Muito Desfavorável	2 pontos

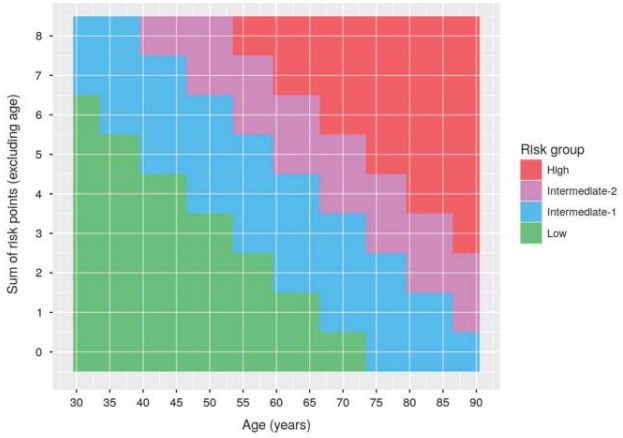
- *0 = Baixo*
- *1 = Intermediário 1*
- *2 = Intermediário 2*
- *3 ou + = Alto*

( ) Baixo ( ) Intermediário 1 ( ) Intermediário 2 ( ) Alto ( ) ND

MYSEC-PM

Hemoglobina < 11,0 g/dl	SIM - 2	NÃO - 0
Blastos 3% ou +	SIM - 2	NÃO - 0
CARL 1 ou 2 negativo	SIM - 2	NÃO - 0
Plaquetas <150x10^9/L	SIM - 1	NÃO - 0
Sintomas Constitucionais	SIM – 1	NÃO - 0

Idade – plotar no quadro abaixo juntamente com pontos



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood. 1951(6):4.
2. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science. 1960;142:1.
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. The Lancet. 2005;365(9464):1054-61.
4. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. nature. 2005;434(7037):1144-8.
5. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. New England Journal of Medicine. 2005;352(17):1779-90.
6. Liu G, Zhao X, Perna F, Wang L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, et al. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. Cancer cell. 2011;19(2).
7. Shammo JM, Stein BL. Mutations in MPNs: prognostic implications, window to biology, and impact on treatment decisions. Hematology American Society of Hematology Education Program. 2016;2016(1).
8. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med. 2006;3(7):e270.
9. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood. 2006;108(10).
10. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. New England Journal of Medicine. 2013;369(25):2379-90.

11. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. New England Journal of Medicine. 2013;369(25):2391-405.

12. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. Blood cancer journal. 2018;8(2).

13. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. American journal of hematology. 2021;96(1).

14. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. leukemia. 2008;22(1):14-22.

15. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-2405. Blood. 2016;128(3).

16. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976–1995. American journal of hematology. 1999;61(1):10-5.

17. Visani G, Finelli C, Castelli U, Petti M, Ricci P, Vianelli N, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. British journal of haematology. 1990;75(1):4-9.

18. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Gangat N, Vaidya R, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the mayo clinic experience. Mayo Clinic proceedings. 2012;87(1).

19. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. Blood. 2014;124(16).

20. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Blood. 2009;113(13).

21. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). Blood. 2010;115(9).
22. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2011;29(4).
23. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2018;36(4).
24. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. The New England journal of medicine. 2000;342(17).
25. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia. 2014;28(7).
26. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. Leukemia. 2013;27(9).
27. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, Biamonte F, Pardanani A, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. Leukemia. 2014;28(9).
28. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. Blood advances. 2016;1(2).
29. Keohane C, Radia DH, Harrison CN. Treatment and management of myelofibrosis in the era of JAK inhibitors. Biologics : targets & therapy. 2013;7.
30. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. The New England journal of medicine. 2013;369(25).

31. De Keersmaecker K, Cools J. Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. Leukemia. 2006;20(2).

32. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Leukemia. 2008;22(2).

33. Passamonti F, Giorgino T, Mora B, Guglielmelli P, Rumi E, Maffioli M, et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. Leukemia. 2017;31(12).

34. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, Zhang MJ, Bashey A, Bolwell BJ, et al. Outcome of transplantation for myelofibrosis. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2010;16(3).

35. McLornan D, Szydlo R, Koster L, Chalandon Y, Robin M, Wolschke C, et al. Myeloablative and Reduced-Intensity Conditioned Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Myelofibrosis: A Retrospective Study by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2019;25(11).

36. Tefferi A, Partain DK, Palmer JM, Slack JL, Roy V, Hogan WJ, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant overcomes the adverse survival effect of very high risk and unfavorable karyotype in myelofibrosis. American journal of hematology. 2018;93(5).

37. Gagelmann N, Ditschkowski M, Bogdanov R, Bredin S, Robin M, Cassinat B, et al. Comprehensive clinical-molecular transplant scoring system for myelofibrosis undergoing stem cell transplantation. Blood. 2019;133(20).

38. Gerds AT. NCCN Guidelines Version 1.2021 Myeloproliferative Neoplasms www.nccn.org/patients2021

39. How J, Hobbs GS. A Practical Guide for Using Myelofibrosis Prognostic Models in the Clinic. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN. 2020;18(9).

40. Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. Blood. 1996;88(3).

41. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Rafel M, Cobo F, Rozman C, et al. Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. British journal of haematology. 1997;97(3).

42. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, Reilly J, Guarnone R, Dupriez B, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. British journal of haematology. 1998;102(3).

43. Elliott MA, Verstovsek S, Dingli D, Schwager SM, Mesa RA, Li CY, et al. Monocytosis is an adverse prognostic factor for survival in younger patients with primary myelofibrosis. Leukemia research. 2007;31(11).

44. Tefferi A, Huang J, Schwager S, Li CY, Wu W, Pardanani A, et al. Validation and comparison of contemporary prognostic models in primary myelofibrosis: analysis based on 334 patients from a single institution. Cancer. 2007;109(10).

45. Tefferi A, Siragusa S, Hussein K, Schwager SM, Hanson CA, Pardanani A, et al. Transfusion-dependency at presentation and its acquisition in the first year of diagnosis are both equally detrimental for survival in primary myelofibrosis--prognostic relevance is independent of IPSS or karyotype. American journal of hematology. 2010;85(1).

46. Patnaik MM, Caramazza D, Gangat N, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A.. Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival. European journal of haematology. 2010;84(2).

47. Hussein K, Pardanani AD, Van Dyke DL, Hanson CA, Tefferi A. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. Blood. 2010;115(3).

48. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. Leukemia. 2011;25(1).

49. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Lasho TL, Gangat N, Begna KH, et al. Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: analysis based on 1002 informative patients. Leukemia. 2018;32(5).

50. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Gangat N, Ketterling RP, Pardanani A, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. 2018;36(17).

51. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. Leukemia. 2018;32(7).

52. Nicolosi M, Mudireddy M, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, et al. Sex and degree of severity influence the prognostic impact of anemia in primary myelofibrosis: analysis based on 1109 consecutive patients. Leukemia. 2018;32(5).

53. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. Leukemia. 2018;32(10).

54. Santos FPS, Getta B, Masarova L, Famulare C, Schulman J, Datoguia TS, et al. Prognostic impact of RAS-pathway mutations in patients with myelofibrosis. Leukemia. 2020;34(3).

55. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. The New England journal of medicine. 2018;379(15).

56. Pakkala A, Ruutu T, Partanen S, Kovanen R, Borgström GH, Knuutila S. Peripheral blood cells in the study of chromosome aberrations of patients with chronic myeloid leukaemia or myelofibrosis. Acta haematologica. 1983;70(4).

57. Lichtman MA. Williams Hemaology. Seventh ed: McGraw-Hill Medical; 2006.

58. Tefferi A, Meyer RG, Wyatt WA, Dewald GW. Comparison of peripheral blood interphase cytogenetics with bone marrow karyotype analysis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. British journal of haematology. 2001;115(2).

59. Didone A, Nardinelli L, Marchiani M, Ruiz ARL, de Lima Costa AL, Lima IS, et al. Comparative study of different methodologies to detect the JAK2 V617F

mutation in chronic BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. Practical laboratory medicine. 2015;4.

60. Shaffer LG, Tommerup N. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. first edition ed: S Karger Ag; 2005. 130 p.

61. WHO. World Medical Association Declaration of Helsinki https://www.who.int/bulletin/archives/79(4)373.pdf2001 [

62. Jatene AB. RESOLUÇÃO Nº 196, DE 10 DE OUTUBRO DE 1996. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/1996/res0196_10_10_1996.html: Ministério da Saúde; 1996.

63. ICMJE. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature icmje.org2019 [Available from: http://www.icmje.org/recommendations/.

64. Linardi Cda C, Dalessandro T, Pracchia LF, Buccheri V. Evaluation of survival risk scores in primary myelofibrosis: a Brazilian experience from a single institution. Leukemia & lymphoma. 2008;49(8).

65. da Silva RR, Domingues Hatzlhofer BL, Machado CG, Lima AS, de Albuquerque DM, dos Santos MN,, et al. JAK2 V617F mutation prevalence in myeloproliferative neoplasms in Pernambuco, Brazil. Genetic testing and molecular biomarkers. 2012;16(7).

66. Benites BD, Lima CS, Lorand-Metze I, Delamain MT, Oliveira GB, Almeida Dd,, et al. Primary myelofibrosis: risk stratification by IPSS identifies patients with poor clinical outcome. Clinics (Sao Paulo, Brazil). 2013;68(3).

67. Souza MC, Rodrigues CA, Silva MR, Ribeiro J, Tognon R, Castro FA, et al. Application of five prognostic survival scores to primary myelofibrosis in 62 Brazilian patients. Medical oncology (Northwood, London, England). 2013;30(2).

68. Nunes DP, Lima LT, Chauffaille Mde L, Mitne-Neto M, Santos MT, Cliquet MG, et al. CALR mutations screening in wild type JAK2(V617F) and MPL(W515K/L) Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. Blood cells, molecules & diseases. 2015;55(3).

69. Monte-Mor Bda C, Ayres-Silva Jde P, Correia WD, Coelho AC, Solza C, Daumas AH, et al. Clinical features of JAK2V617F- or CALR-mutated essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. Blood cells, molecules & diseases. 2016;60.

70. Porto-Soares MA, de Oliveira RD, Cortopassi GM, Machado-Neto JA, Palma LC, Figueiredo-Pontes LL. Clinical and molecular profile of a Brazilian cohort of patients with classical BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. Hematology, transfusion and cell therapy. 2020;42(3).

71. Nonino A, Campregher PV, de Souza Santos FP, Mazzeu JF, Pereira RW. Genomic characterization and prognostication applied to a Brazilian cohort of patients with myelofibrosis. International journal of hematology. 2020;112(3).

72. Santos LCd, Universidade Federal de São Paulo SP, Brazil, Ribeiro JCdC, Universidade Federal de São Paulo SP, Brazil, Silva NP, Universidade Federal de São Paulo SP, Brazil, et al. Cytogenetics, JAK2 and MPL mutations in polycythemia vera, primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. Rev Bras Hematol Hemoter. 2011;33(6):417-24.

73. Macedo LC, Santos BC, Pagliarini-e-Silva S, Pagnano KB, Rodrigues C, Quintero FC, et al. JAK2 46/1 haplotype is associated with JAK2 V617F--positive myeloproliferative neoplasms in Brazilian patients. International journal of laboratory hematology. 2015;37(5).

74. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. Blood. 2014;124(7).

75. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, Verstovsek S, Mesa R, Kiladjian JJ, Hehlmann R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. Leukemia. 2018;32(5).

76. Passamonti F, Mora B, Giorgino T, Guglielmelli P, Cazzola M, Maffioli M, et al. Driver mutations' effect in secondary myelofibrosis: an international multicenter study based on 781 patients. Leukemia. 2017;31(4).

77. Tavares R, Souza CA, Paley C, Bouard C, Tiwari R, Pasquini R.. A subgroup analysis of JUMP, a phase IIIb, expanded-access study evaluating the safety and efficacy of ruxolitinib in patients with myelofibrosis in a Brazilian cohort. Hematology, transfusion and cell therapy. 2020;42(1).

78. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. The New England journal of medicine. 2012;366(9).
79. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. The New England journal of medicine. 2012;366(9).
80. Verstovsek S, Gotlib J, Mesa RA, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Cervantes F, et al. Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. Journal of hematology & oncology. 2017;10(1).
81. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoops L, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. Leukemia. 2016;30(8).
82. Patel KP, Newberry KJ, Luthra R, Jabbour E, Pierce S, Cortes J, et al. Correlation of mutation profile and response in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. Blood. 2015;126(6).
83. Coltro G, Rotunno G, Mannelli L, Mannarelli C, Fiaccabrino S, Romagnoli S, et al. RAS/CBL mutations predict resistance to JAK inhibitors in myelofibrosis and are associated with poor prognostic features. Blood advances. 2020;4(15).
84. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Szuber N, Finke CM, Lasho TL, et al. Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. American journal of hematology. 2018;93(3).
85. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Blood. 2016;127(3).
86. Chang YC, Lin HC, Chiang YH, Chen CG, Huang L, Wang WT, et al. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Medical oncology (Northwood, London, England). 2017;34(5).
87. Acha P, Xandri M, Fuster-Tormo F, Palomo L, Xicoy B, Cabezón M, et al. Diagnostic and prognostic contribution of targeted NGS in patients with triple-negative myeloproliferative neoplasms. American journal of hematology. 2019;94(10).

88. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. Blood. 2016;127(3).

89. Langabeer SE. Chasing down the triple-negative myeloproliferative neoplasms: Implications for molecular diagnostics. JAK-STAT. 2016;5(2-4).

90. Coleman JF, Theil KS, Tubbs RR, Cook JR. Diagnostic yield of bone marrow and peripheral blood FISH panel testing in clinically suspected myelodysplastic syndromes and/or acute myeloid leukemia: a prospective analysis of 433 cases. American journal of clinical pathology. 2011;135(6).

91. Asadi Fakhr Z, Mehrzad V, Izaditabar A, Salehi M. Evaluation of the utility of peripheral blood vs bone marrow in karyotype and fluorescence in situ hybridization for myelodysplastic syndrome diagnosis. Journal of clinical laboratory analysis. 2018;32(9).

92. Braulke F, Schulz X, Germing U, Schuler E, Platzbecker U, Nolte F, et al. Peripheral blood cytogenetics allows treatment monitoring and early identification of treatment failure to lenalidomide in MDS patients: results of the LE-MON-5 trial. Annals of hematology. 2017;96(6).

93. Mohamedali AM, Alkhatabi H, Kulasekararaj A, Shinde S, Mian S, Malik F, et al. Utility of peripheral blood for cytogenetic and mutation analysis in myelodysplastic syndrome. Blood. 2013;122(4).

94. Rotunno G, Pacilli A, Artusi V, Rumi E, Maffioli M, Delaini F, et al. Epidemiology and clinical relevance of mutations in postpolycythemia vera and postessential thrombocythemia myelofibrosis: A study on 359 patients of the AGIMM group. American journal of hematology. 2016;91(7).

95. Courtier F, Garnier S, Carbuccia N, Guille A, Adélaide J, Chaffanet M, et al. Targeted molecular characterization shows differences between primary and secondary myelofibrosis. Genes, chromosomes & cancer. 2019.

96. Tefferi A, Saeed L, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Gangat N. Application of current prognostic models for primary myelofibrosis in the setting of post-polycythemia vera or post-essential thrombocythemia myelofibrosis. Leukemia. 2017;31(12).

97. Hernández-Boluda JC, Pereira A, Correa JG, Alvarez-Larrán A, Ferrer-Marín F, Raya JM, et al. Performance of the myelofibrosis secondary to PV and

ET-prognostic model (MYSEC-PM) in a series of 262 patients from the Spanish registry of myelofibrosis. Leukemia. 2018;32(2).

98. Gagelmann N, Eikema DJ, de Wreede LC, Koster L, Wolschke C, Arnold R, et al. Comparison of Dynamic International Prognostic Scoring System and MYelofibrosis SECondary to PV and ET Prognostic Model for Prediction of Outcome in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia Myelofibrosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2019;25(6).

99. Tavares RS, Nonino A, Pagnano KBB, Nascimento ACKVD, Conchon M, Fogliatto LM, et al. Guideline on myeloproliferative neoplasms: Associacão Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Cellular: Project guidelines: Associação Médica Brasileira - 2019. Hematology, transfusion and cell therapy. 2019;41 Suppl 1(Suppl 1).

100. Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, Barbui T, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. Leukemia. 2015;29(11).

101. Verstovsek S, Yu J, Kish JK, Paranagama D, Kaufman J, Myerscough C, et al. Real-world risk assessment and treatment initiation among patients with myelofibrosis at community oncology practices in the United States. Annals of hematology. 2020;99(11).

102. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Blood. 2014;123(14).

103. Samuelson Bannow BT, Salit RB, Storer BE, Stevens EA, Wu D, Yeung C, et al. Hematopoietic Cell Transplantation for Myelofibrosis: the Dynamic International Prognostic Scoring System Plus Risk Predicts Post-Transplant Outcomes. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2018;24(2).

104. Kröger N, Giorgino T, Scott BL, Ditschkowski M, Alchalby H, Cervantes F, et al. Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis. Blood. 2015;125(21).

105. Ali H, Aldoss I, Yang D, Mokhtari S, Khaled S, Aribi A, et al. MIPSS70+ v2.0 predicts long-term survival in myelofibrosis after allogeneic HCT with the Flu/Mel conditioning regimen. Blood advances. 2019;3(1).

106. Kröger N, Panagiota V, Badbaran A, Zabelina T, Triviai I, Araujo Cruz MM, et al. Impact of Molecular Genetics on Outcome in Myelofibrosis Patients after Allogeneic Stem Cell Transplantation. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2017;23(7).

107. Funke VAM, Vigorito AC, Teixeira GM, Paz A, Silva CC, Nascimento VM. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant for Myelofibrosis in Brazil: Facing Our Challenges. Transplantation and Cellular Therapy. 2021;27(3):S159.

108. Gale RP, Seber A, Bonfim C, Pasquini M. Haematopoietic cell transplants in Latin America. Bone marrow transplantation. 2016;51(7).

109. Jaimovich G, Martinez Rolon J, Baldomero H, Rivas M, Hanesman I, Bouzas L, et al. Latin America: the next region for haematopoietic transplant progress. Bone marrow transplantation. 2017;52(5).

110. Jaimovich G, Gale RP, Hanesman I, Rolón JM. The state of haematopoietic cells transplantation in Latin America. The Lancet Haematology. 2021;8(1).

111. Palandri F, Palumbo GA, Bonifacio M, Breccia M, Latagliata R, Martino B, et al. Durability of spleen response affects the outcome of ruxolitinib-treated patients with myelofibrosis: Results from a multicentre study on 284 patients. Leukemia research. 2018;74.

112. Polverelli N, Mauff K, Kröger N, Robin M, Beelen D, Beauvais D, et al. Impact of spleen size and splenectomy on outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis: A retrospective analysis by the chronic malignancies working party on behalf of European society for blood and marrow transplantation (EBMT). American journal of hematology. 2021;96(1).