

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Gabriela Peragine Celiberto

BASES MOLECULARES DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

São Paulo
2019

Gabriela Peragine Celiberto

BASES MOLECULARES DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa. Dr. Renata Cristina Pardos Baida Andreoli, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2019

Gabriela Peragine Celiberto

AS BASES MOLECULARES DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

São Paulo, 4 de novembro de 2019

Professora Orientadora: Dra. Renata Cristina Pardos Baida Andreoli

Professor Examinador: Dr. Fabio Mitsuo Lima

São Paulo

2019

Dedico esse trabalho à minha avó Judite pelo apoio, amor incondicional e sempre acreditar nos meus sonhos enquanto esteve ao meu lado nessa vida, e à minha mãe Tais que, tendo a doença abordada nesse trabalho, me permitiu buscar uma explicação e um maior conhecimento para poder entender o que se passava com ela.

AGRADECIMENTO

À orientadora Profa. Dr. Renata Cristina Pardos Baida Andreoli Renata, pela confiança e orientação, pelo grande apoio e auxílio no desenvolvimento do trabalho, pelo compartilhamento de sugestões, opiniões, dúvidas e ensinamentos.

Aos familiares Roberto, Tais e Beatriz por sempre darem apoio.

À colega July pelo compartilhamento de sugestões, auxílio no desenvolvimento do trabalho e compartilhamento de opiniões.

À colega Gabriela por ajudar na formatação do trabalho e compartilhamento de sugestões.

Às colegas Bárbara, Bruna, Fernanda, Giovana, Marcelle, Patrícia e Priscila por sempre darem apoio, pelo compartilhamento de conhecimento, opiniões e dúvidas, e em todos momentos de descontração.

Ao Centro Universitário São Camilo pela infraestrutura e disponibilidade de recursos necessários para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Deus.

RESUMO

A Mielofibrose Primária é uma doença hematológica classificada no grupo de neoplasias mieloproliferativas que se caracteriza pela proliferação anormal da célula-tronco hematopoiética de uma ou mais linhagens mieloides, como megacariocítica e granulocítica, na medula óssea, causada pelas mutações nos genes *Janus kinase 2* (JAK2), Calreticulina (CALR) ou no receptor de trombopoetina (MPL). Essas mutações permitem que os receptores, tanto de eritropoetina quanto de trombopoetina, fiquem hiperativos e independente dessas citocinas, levando a uma proliferação constitutiva dos precursores afetados. A doença é assintomática na maioria das vezes, porém pode ocorrer sintomas de acordo com a(s) linhagem(s) afetada(s), como anemia, esplenomegalia, sangramentos e hemorragias, leucocitose e leucopenia. Seu diagnóstico se dá pela realização de exames hematológicos, como hemograma, biópsia de medula óssea, mielograma, identificação de possível cariótipo e métodos moleculares, que este por sua vez está cada vez mais relevante na Mielofibrose Primária por conta dos sintomas clínicos inespecíficos que podem ser confundidos com as outras neoplasias mieloproliferativas, além das variações nos achados hematológicos. Dentre os métodos moleculares se destaca a reação em cadeia da polimerase (PCR), podendo ser multiplex alelo específica, tempo real e digital, além do sequenciamento. A procura nesses métodos é para o alelo mutado tanto para JAK2 quanto para CALR e MPL. Seu prognóstico se dá pela hematopoese extramedular, fibrose progressiva da medula e transformação da doença para leucemia. Por fim, o tratamento para essa doença pode incluir inibidores de JAK, drogas citorredutoras, agentes estimuladores da eritropoiese, agentes imunomoduladores e andrógenos. A cura é estabelecida somente com o transplante de célula-tronco alogênica.

Palavras-chave: Células-tronco. Doenças da medula óssea. Mielofibrose primária - diagnóstico. Transtornos mieloproliferativos. Trombopoetina.

ABSTRACT

Primary Myelofibrosis is a haematological disease classified in the group of myeloproliferative neoplasms characterized by abnormal proliferation of hematopoietic stem cell of one or more myeloid strains in the bone marrow, such as megakaryocytic and granulocytic, caused by mutations in the genes *Janus kinase 2* (JAK2), Calreticulin (CALR) or thrombopoietin receptor (MPL). These mutations allow the erythropoietin and thrombopoietin receptor to become hyperactive and independent of these cytokines, leading to constitutive proliferation of the affected precursors. The disease is asymptomatic most cases, but symptoms may occur according to the affected lineages, such as anemia, splenomegaly, bleeding, leukocytosis and leukopenia. Its diagnosis is made by hematological exams, such as blood count, bone marrow biopsy, myelogram, identification of possible karyotype and molecular methods, which is becoming more relevant in Primary Myelofibrosis diagnosis because of nonspecific clinical symptoms that may be confused with other myeloproliferative neoplasms, in addition to variations in hematological findings. Polymerase chain reaction (PCR) is used, and can be multiplex specific allele, real time and digital, in addition to sequencing. The search for these methods is for the mutated allele for both JAK2 and CALR and MPL. Its prognosis is due to extramedullary hematopoiesis, progressive marrow fibrosis and transformation of the disease to leukemia. Finally, the treatment for this disease may include JAK inhibitors, cytoreductive drugs, erythropoiesis stimulating agents, immunomodulatory agents, and androgens. Cure is established only with allogeneic stem cell transplantation.

Palavras-chave: Stem cells. Bone marrow diseases. Primary myelofibrosis diagnosis. Myeloproliferative disorders. Thrombopoietin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hematopoese	20
Figura 2 – Via de sinalização JAK-STAT no receptor de eritropoetina e de Trombopoetina	21
Figura 3 – Proteína JAK e seus domínios	22
Figura 4 – Localização da mutação no gene JAK2	23
Figura 5 – Sinalização trombopoetina em seu receptor	24
Figura 6 – Via JAK-STAT ativada graças a sinalização da CALR-mutada.....	26
Figura 7 – Mecanismo envolvendo TGF- β 1, o miR-382-5p e EROs	29
Figura 8 – Processo inflamatório na medula óssea que leva a fibrose	31
Figura 9 – Biopsia de medula óssea de Mielofibrose Primária Pré-fibrótica	32
Figura 10 – Biopsia de medula óssea pré-fibrótica	33
Figura 11 – Biopsia de medula óssea com JAK2V617F positivo	33
Figura 12 – Biopsia de medula óssea de Mielofibrose Primária Fibrótica	34
Figura 13 – Biopsia de medula óssea fibrótica.....	34
Figura 14 – Fibras de reticulina com fibrose grau 2	34
Figura 15 – Biopsia de medula óssea fibrótica com JAK2V617F positivo	34
Figura 16 – Eletroforese da mutação JAK2 éxon 12	36
Figura 17 – Eletroforese da mutação CALR tipo 1 e tipo 2	37
Figura 18 – Amplificação da mutação JAK2V617F em paciente.....	38
Figura 19 – Amplificação da mutação JAK2V617F em controle positivo	38
Figura 20 – Amplificação da mutação JAK2V617F em controle negativo	39
Figura 21 – Eletroforese de amostras para a pesquisa do fenótipo S505N	40

Figura 22 – Eletroferograma do fenótipo W515L.....	41
Figura 23 – Eletroferograma do fenótipo W515L de homozigoto e heterozigoto .	41
Figura 24 – Eletroferograma dos fenótipos MPL	41
Figura 25 – Eletroferograma evidenciando a mutação CALR Tipo 1 e Tipo 2	42
Figura 26 – Amplificação do gene CALR tipo 2.....	43
Figura 27 – Esquema de tratamento de cada prognóstico do sistema MIPSS70	49
Figura 28 – Esquema de tratamento de cada prognóstico do sistema GIPSS.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação CID-O das neoplasias mieloproliferativas.....	14
Tabela 2 – Classificação OMS do grau de fibrose medular	35
Tabela 3 – Primers das mutações utilizados no PCR	36
Tabela 4 – Primer de qPCR utilizando o sistema de TaqMan	38
Tabela 5 – Primer de qPCR utilizando o sistema de SYBR Green	38
Tabela 6 – Primers de PCR multiplex alelo específico.....	39
Tabela 7 – Vantagens de cada técnica	44
Tabela 8 – Desvantagens de cada técnica	44
Tabela 9 – Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional	46
Tabela 10 – Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional por Mutação	47
Tabela 11 – Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional por Genética.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
3	METODOLOGIA	18
4	HEMATOPOESE	19
5	VIA JAK-STAT	21
6	MUTAÇÕES ACOMETIDAS NA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA	23
6.1	JAK2	23
6.2	MPL	23
6.3	CALR	25
7	MICRO RNA.....	27
7.1	miR-494-3p	27
7.2	miR-382-5p	28
8	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	30
8.1	Fibrose Medular	30
8.2	Anemia	31
9	DIAGNÓSTICO	32
9.1	Diagnóstico molecular.....	35
9.1.1	Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)	35
9.1.2	PCR Tempo Real (qPCR)	37
9.1.3	PCR Multiplex Alelo Específico.....	39
9.1.4	Sequenciamento de Sanger	40
9.1.5	PCR Digital (dPCR)	42

9.1.6 qPCR x Sanger x dPCR.....	43
9.2 Cariótipo.....	45
10 PROGNÓSTICO	46
11 TRATAMENTO	49
11.1 Inibidores de JAK.....	50
11.2 Drogas Citorredutoras.....	51
11.3 Agentes Estimuladores da Eritropoiese (AEEs)	52
11.4 Agentes Imunomoduladores (IMiDs)	52
11.5 Andrógenos	53
11.6 Transplante de células-tronco alogênica.....	53
12 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas são doenças hematológicas caracterizadas pelo aumento de uma ou mais linhagens mieloides na medula óssea, a granulocítica, eritrocítica, megacariocítica e mastocítica, com consequente aumento no sangue periférico. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), essas doenças são classificadas como BCR-ABL 1 negativas, com exceção da leucemia mieloide crônica (ZERBINI et al., 2011; OMS, 2005).

Essa classificação diz respeito ao cromossomo Philadelphia, uma anomalia cromossômica envolvendo a translocação recíproca dos braços longos dos cromossomos 9, gene ABL, e o cromossomo 22, gene BCR, resultando no fenótipo oncogene BCR-ABL1. Esse oncogene codifica para uma proteína tirosina cinase constitutivamente ativa, levando ao desenvolvimento da leucemia (FLIS; CHOJNACKI, 2019). A Classificação Internacional de Doenças Oncológicas (CID-O) da OMS inclui nas neoplasias mieloproliferativas doenças como as listadas na tabela 1, além da neoplasia mieloproliferativa crônica inclassificável, de difícil diagnóstico (ZERBINI et al., 2011; OMS, 2005).

Tabela 1: Classificação CID-O das neoplasias mieloproliferativas

	BCR-ABL1	Característica	Referências
Leucemia mieloide crônica	Positivo	Aumento da proliferação da linhagem mieloide, resistência a apoptose e liberação de células imaturas no sangue periférico	FLIS; CHOJNACKI, 2019
Leucemia neutrofílica crônica	Negativo	Proliferação persistente e predominantemente de neutrófilos maduros, hiperplasia da linhagem granulocítica na medula óssea e esplenomegalia	SZUBER; TEFFERI, 2018
Leucemia eosinofílica crônica	Desconhecido	Proliferação persistente dos precursores eosinofílicos na medula óssea, levando ao aumento de eosinófilos no sangue periférico e infiltração nos tecidos	HOFMANS et al., 2018
Policitemia Vera (PV)	Negativo	Proliferação anormal e constitutiva dos precursores mieloides na medula óssea, levando a um aumento, sobretudo eritroide, no sangue periférico	GINZBURG et al., 2018
		Evolução para mielofibrose com risco de 10 a 20%	
		Risco de trombose arterial e venosa de 41%	
Trombocitemia essencial (TE)	Negativo	Proliferação anormal e constitutiva dos precursores megacariócitos na medula óssea, levando a uma trombocitose	GADOMSKA et al., 2019
		Risco de uma transformação leucêmica de 3,8%	
		Evolução para mielofibrose de 10,3%	
		Eventos trombóticos de 7,6 a 29,4%	
		Eventos hemorrágicos de 3 a 18%	
Mielofibrose Primária (MFP)	Negativo	Proliferação anormal e constitutiva dos precursores de uma ou mais linhagem mieloide	RIZVI et al., 2019

A principal etiologia das doenças BCR-ABL1 negativas é a mutação somática no gene *Janus Kinase 2* (JAK2), cromossomo 9, éxon 14, descoberta em 2005. As três doenças mais comuns dentro das neoplasias mieloproliferativas são: a Policitemia Vera (PV), a Trombocitemia essencial (TE) e a Mielofibrose Primária (MFP). A

incidência da mutação JAK2 em pacientes diagnosticados é de 90 a 98% para PV, enquanto em pacientes com TE e MFP é de 50 a 60% (SOYER et al., 2017). Além disso, no caso da PV, outra mutação que pode ocorrer é JAK2 éxon 12, com incidência de 2 a 3% (GINZBURG et al., 2018).

A Mielofibrose Primária caracteriza-se pela proliferação clonal da célula-tronco hematopoiética na medula óssea, o que leva a uma proliferação exagerada e anormal dos precursores de uma ou mais linhagens mieloides, como megacariocítica e granulocítica. Os principais sintomas são: anemia, esplenomegalia, hematopoese extramedular, leucocitose, leucopenia, trombocitose e fibrose medular progressiva que, dependendo do estágio e grau da fibrose, é comum não se obter um bom resultado na biopsia de medula óssea (RIZVI et al., 2019; O'SULLIVAN, 2019; SCHUBERT et al., 2019; AZEVEDO et al., 2017).

A incidência da MFP é de 6 por 100.000 pessoas por ano, sendo que ambos os sexos podem ser afetados, embora exista uma prevalência maior em homens (HINTERMAIR et al., 2018). Além da mutação JAK2, outras podem ocorrer isoladamente ou não para que as manifestações clínicas e o diagnóstico sejam direcionados à doença: mutação no gene Calreticulina (CALR), com incidência de 20%, e mutação no receptor de Trombopoetina (MPL), com incidência de 7% (TEFFERI; VANNUCCHI; BARBUI, 2018).

Contudo, é possível encontrar pacientes com MFP triplo-negativo, que não apresentam nenhuma das 3 mutações principais. Geralmente, nesses casos, as mutações acontecem em outros genes responsáveis pela regulação epigenética e componentes do *spliceossoma* (maquinaria de ribonucleoproteínas pós-transcrição). São exemplos dessas mutações: TET2 (17% nos casos), IDH1/2 (1 a 4%, com prognóstico desfavorável), EZH2 (12%, com prognóstico desfavorável), ASXL1 (22 a 38% com prognóstico desfavorável), TP53 (menor que 5%), DNMT3A (5 a 10% nos casos e sem feito no prognóstico), RUNX1 (menor que 5%, com prognóstico desfavorável), SRSF2 (9%, com prognóstico desfavorável), U2AF1 (10 A 17%, prognóstico desfavorável), CEBPA (9%, com prognóstico desfavorável), CBL (4%, com prognóstico desfavorável), KIT (1%, com prognóstico desfavorável) e SH2B3/LNK (11 a 18%, com prognóstico desfavorável) (PALUMBO et al., 2019;

BOSE; VERSTOVSEK, 2016). Esses prognósticos desfavoráveis estão relacionados ao aumento no risco de transformação leucêmica (LEIVA et al., 2017).

Por fim, é importante discutir a fisiopatologia da doença, suas mutações e métodos diagnósticos específicos, sensíveis e de modo precoce, para iniciar a intervenção terapêutica correta, já que a idade dos pacientes diagnosticados é por volta de 70 anos e sua sobrevida média é de 6 anos, com graves manifestações clínicas, como anemia e leucocitose (SOYER et al., 2017; MESA et al., 2016) e alto risco da transformação leucêmica da medula (10 a 20% dos casos no período de 10 anos). Pode levar de 10 a 15 anos para essa transformação se consolidar e, após definitivamente instalada, afeta diretamente a sobrevida, reduzindo para somente 2,6 meses daqueles pacientes que recebem o tratamento adequado (LIN et al., 2019).

2 OBJETIVO

Realizar um levantamento bibliográfico em artigos científicos de bases de dados e revistas eletrônicas para analisar e discutir as informações sobre o mecanismo de patogênese da Mielofibrose Primária, enfocando em estruturas moleculares e genéticas, além de discutir prognóstico, tratamento e diagnósticos diferenciais para a neoplasia, abordando métodos moleculares sensíveis utilizados na clínica médica.

3 METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foram utilizados artigos científicos nas bases de dados como LILACS, PubMed, Google Acadêmico e a revista eletrônica SciELO, selecionando um período de 6 anos, restrição de idioma como português, inglês e espanhol e utilizando os descritores células-tronco (stem cells), doenças da medula óssea (bone marrow diseases), mielofibrose primária – diagnóstico (primary myelofibrosis diagnosis), transtornos mieloproliferativos (myeloproliferative disorders) e trombopoetina (thrombopoietin). Também foram consultados livros de Hematologia e Farmacologia disponibilizados na Biblioteca Padre Inocente Radrizzani do Centro Universitário São Camilo.

4 HEMATOPOESE

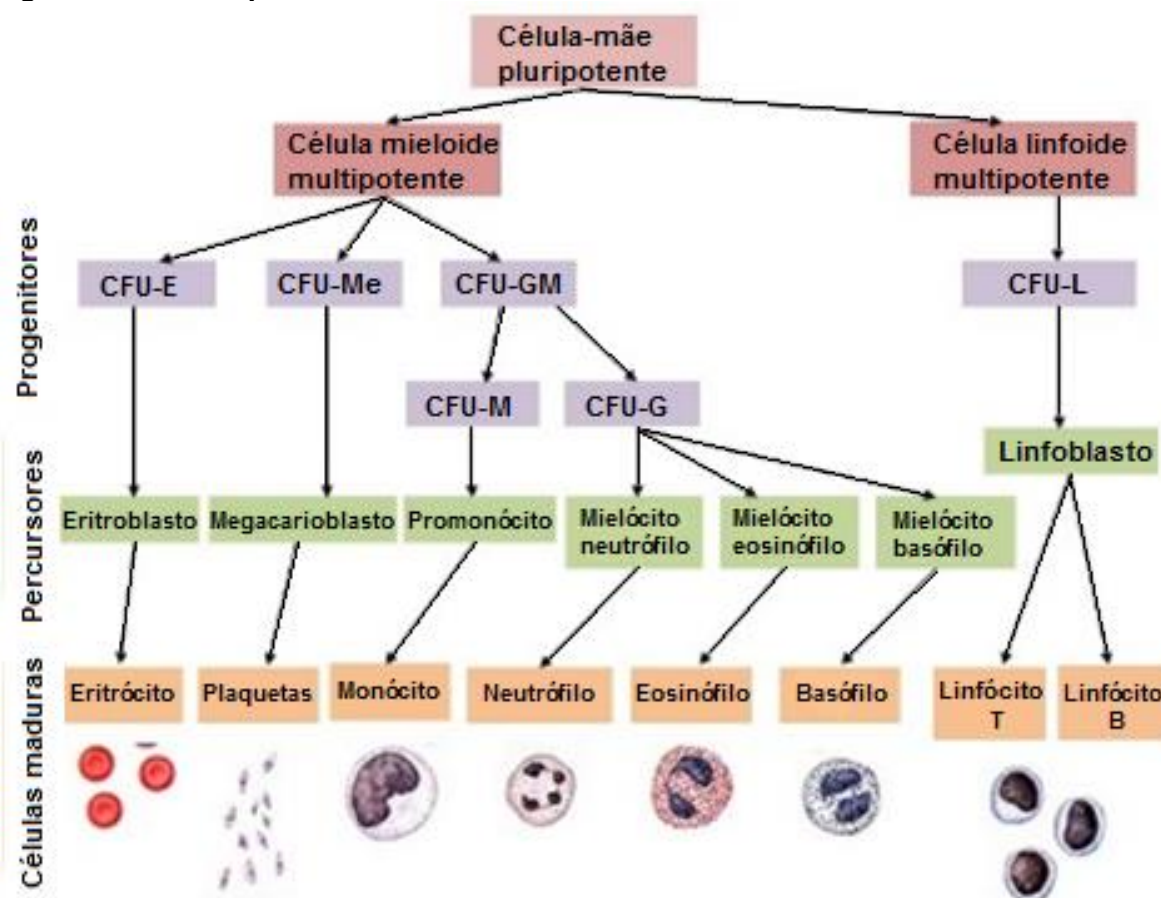
A hematopoese é o processo de maturação e proliferação das células sanguíneas que ocorre na medula óssea de ossos longos até os 4 anos de idade, e nos ossos chatos durante a vida adulta (LAMAS, 2015).

Tudo começa com as células-tronco hematopoiéticas pluripotentes (figura 1), fixadas na medula óssea e que possuem a capacidade de gerar progenitores celulares e de promover a autorrenovação, mantendo a celularidade normal da medula. Dependendo do estímulo presente no microambiente, como a Interleucina 3, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e Interleucinas 1, 6 e 7, a célula-tronco poderá se diferenciar em célula mieloide multipotente e em célula linfóide multipotente, respectivamente (LAMAS, 2015).

Da linhagem linfóide (CFU-L), a célula linfóide se diferencia em linfoblasto, pró-linfócito e linfócito, necessitando de uma maturação no timo e na medula óssea para apresentar os linfócitos maduros T e B, respectivamente (LAMAS, 2015).

Da linhagem mieloide (CFU-GEMM), a célula mieloide necessita de estímulos específicos para se diferenciar em qualquer célula madura. A eritropoetina é um estímulo nesse microambiente para a célula progenitora se diferenciar em pró-eritroblasto e se maturar em eritrócito. Os fatores de crescimento para granulócitos (CSF-G) estimulam a célula progenitora a se diferenciar em mieloblasto e se maturar em eosinófilo, neutrófilo e basófilo. Os fatores de crescimento para monócitos (CSF-M) estimulam a célula progenitora a se diferenciar em monoblasto e se maturar em monócitos. E, por fim, a trombopoetina estimula a célula progenitora a se diferenciar em megacarioblasto e se maturar em megacariócitos e, em seguida, liberar plaquetas no sangue periférico (LAMAS, 2015).

Figura 1 – Hematopoese



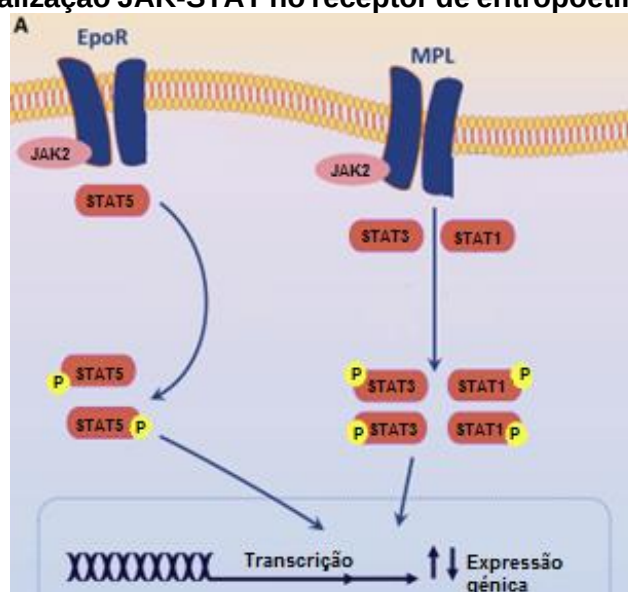
Fonte: Adaptado de SILVA, 2010. A partir de uma célula-tronco pluripotente é possível gerar duas linhagens distintas de células progenitoras, dependendo do estímulo de citocinas presente no microambiente, as células mieloides e células linfoides. Ainda necessitando de estímulos, as células progenitoras se diferenciam em suas respectivas unidades formadoras de colônia (CFU), para assim se diferenciar em seus precursores e posteriormente em células maduras.

5 VIA JAK-STAT

Para ser ativada e exercer sua função de proliferação dos progenitores hematopoiéticos, a sinalização JAK-STAT deverá ser estimulada por fatores de crescimento específicos para eritrócitos, megacariócitos e granulócitos, como eritropoetina, trombopoetina e fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF), respectivamente. Esses fatores de crescimento têm seus receptores na membrana plasmática das células progenitoras hematopoiéticas e, uma vez estimulados, ocorre a dimerização do receptor, permitindo que a proteína tirosina cinase *Janus kinase* (JAK) se associe à porção citoplasmática do receptor, sendo assim, ativada (TVOROGOV et al., 2018; GOUGH et al., 2014).

A proteína JAK ativada fosforila diversas moléculas de tirosina citoplasmáticas, iniciando algumas cascatas de sinalização intracelular. Uma dessas moléculas fosforilada é o fator de transcrição STAT (transdutores de sinal e ativadores da transcrição), que se liga, pelo domínio SH2, a um dos resíduos de tirosina fosforilados do receptor. O STAT fosforilado se desprende do receptor, forma dímeros e é direcionado para o núcleo. No núcleo, o STAT atua na indução da expressão gênica de genes importantes para a proliferação e maturação das células progenitoras hematopoiéticas (figura 2) (TVOROGOV et al., 2018; GOUGH et al., 2014).

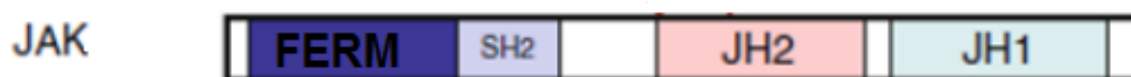
Figura 2 – Via de sinalização JAK-STAT no receptor de eritropoetina e de trombopoetina



Fonte: Adaptado de O'SULLIVAN, 2019. A sinalização feita nos receptores EpoR e MPL após o estímulo da eritropoetina e trombopoetina, respectivamente, se inicia com a proteína JAK2, que se ativa e fosforila o fator de transcrição STAT. Esse fator se desprende do receptor, forma dímeros e segue para o núcleo. No núcleo é feita a transcrição e a regulação da expressão genica das células progenitoras hematopoiéticas, ocorrendo a proliferação e maturação.

A família da proteína JAK possui 4 cinases, JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2, sendo que a JAK2 é responsável por se associar ao receptor da eritropoetina e trombopoetina nas células progenitoras hematopoiéticas e iniciar a cascata de sinalização intracelular descrita acima. A proteína JAK é formada por 7 domínios JH, como podemos observar na figura 3, sendo que JH1 tem atividade cinase, responsável pela fosforilação das moléculas, e JH2 é um domínio pseudocinase, regulador negativo da atividade cinase de JH1. Os dois domínios estão na porção C-terminal da proteína. Os JH5, JH6 e JH7 formam um grande domínio aminoterminal denominado FERM (4.1, Ezrina, Radixina, Moesina), que interagem com JH1 e JH2 impedindo a ativação inadequada da JAK2 (O'SULLIVAN, 2019; HU et al., 2019; GOUGH et al., 2014)

Figura 3 – Proteína JAK e seus domínios



Fonte: Adaptado de MOURA, 2012. O domínio FERM composto pelos domínios JH5, JH6 e JH7 impede a ativação inadequada da proteína JAK2. O domínio SH2 interagem com o fator de transcrição STAT para fosforizá-lo e enviá-lo para o núcleo. O domínio JH2 regula negativamente o domínio JH1, que este fosforila as moléculas de tirosina citoplasmáticas da sinalização, como a STAT.

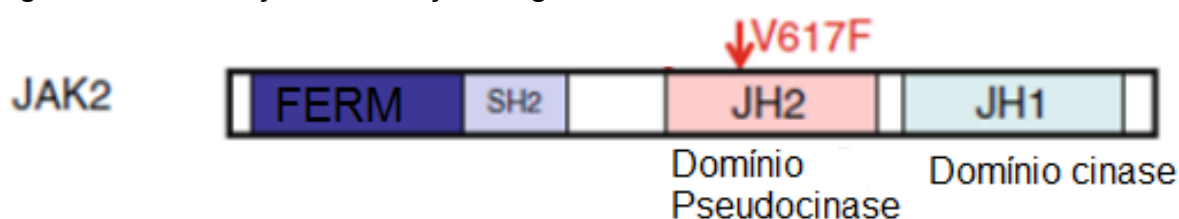
6 MUTAÇÕES NA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

6.1 JAK2

A mutação mais importante e frequente da Mielofibrose Primária, presente em 50 a 60% dos pacientes, é no gene JAK2 das células progenitoras megacariocítica e granulocítica. É decorrente da troca de uma guanina por uma timina no éxon 14 do cDNA, localizado no cromossomo 9p24. Essa troca de nucleotídeo resulta na substituição de uma valina por uma fenilalanina na posição 617, criando uma proteína funcional mutada e um fenótipo JAK2V617F (HU et al., 2019; O'SULLIVAN, 2019; TVOROGOV et al., 2018).

Essa mutação pontual ocorre no gene onde se localiza o domínio JH2, justamente o domínio responsável por frear a atividade cinase do domínio JH1 (figura 4). Uma vez mutada, a proteína JAK2V617F exerce a mesma função que a JAK2 normal, ou seja, fosforila o fator de transcrição STAT, porém, devido a mutação no domínio JH2, a JAK2V617F é capaz de ativar a cascata de sinalização de forma constitutiva, sem necessitar de estímulo pelo fator de crescimento em seu receptor nas células-tronco hematopoiéticas das linhagens megacariocítica e granulocítica. Isso resultará no aumento das células das linhagens mielocíticas afetadas e, conseqüentemente, a diminuição das demais linhagens sem a mutação, por um mecanismo compensatório (HU et al., 2019; O'SULLIVAN, 2019; TVOROGOV et al., 2018).

Figura 4 – Localização da mutação no gene JAK2



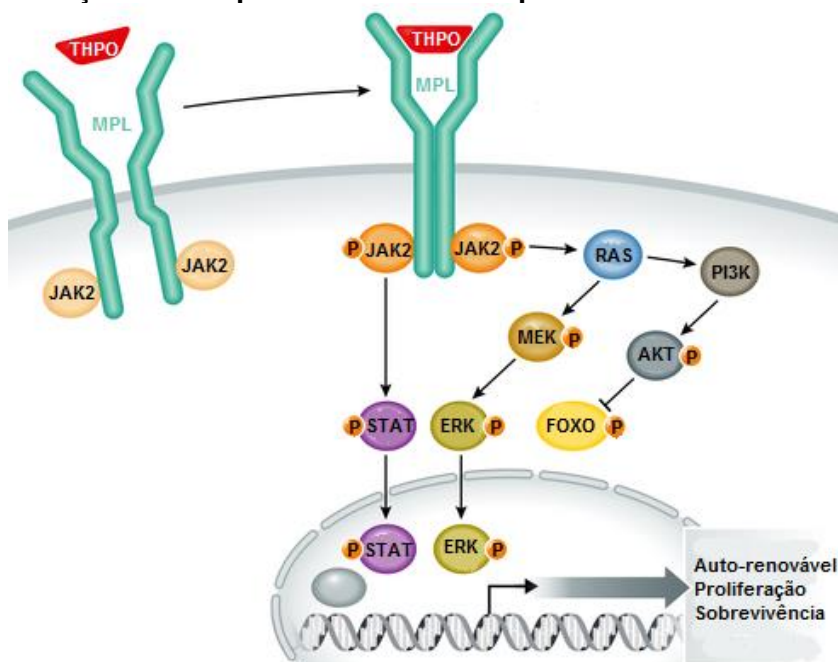
Fonte: Adaptado de MOURA, 2012. Por conta na mutação pontual V617F acontecer no domínio JH2, responsável pela inibição da fosforilação do fator STAT e impedindo a iniciação da cascata de sinalização, perde-se essa inibição e o resultado é a sinalização constitutiva da cascata sem a necessidade de estímulos de citocinas no receptor das células-tronco hematopoiéticas.

6.2 MPL

MPL (Myeloproliferative Leukaemia Virus Oncogene) é o gene que codifica o receptor de trombopoetina nas células progenitoras dos megacariócitos e está localizado no cromossomo 1p24. O receptor de trombopoetina não possui atividade

intrínseca, ou seja, necessita de uma citocina, a trombopoetina, para ativar a cascata de sinalização JAK-STAT e realizar a proliferação e maturação dos megacariócitos (figura 5) (O'SULLIVAN, 2019; SANGKHAIE et al., 2014).

Figura 5 – Sinalização trombopoetina em seu receptor



Fonte: Adaptado de KIM, 2017. A trombopoetina se associa ao seu receptor MPL nas células-tronco hematopoiética, ativa-o e inicia a cascata de sinalização com a proteína JAK2, que fosforila o fator de transcrição STAT. Esse fator se desprende do receptor, forma dímeros e segue para o núcleo. No núcleo é feita a transcrição e a regulação da expressão gênica das células progenitoras hematopoiéticas, ocorrendo a proliferação e maturação.

A mutação mais frequente acontece no éxon 10 do gene MPL, representando entre 5 a 10% dos pacientes com Mielofibrose Primária (PALUMBO et al., 2019). Nesse éxon, já foram descritas duas mutações pontuais: no códon 515 ocorre a substituição de um triptofano por uma lisina, originando o fenótipo MPL W515L, e no códon 505 ocorre a substituição de uma serina por uma asparagina, dando origem ao fenótipo MPL S505N. Qualquer das duas mutações promove a ativação espontânea do receptor (CRISTINA, 2018; O'SULLIVAN; HARRISON, 2017).

Uma vez mutado, o receptor da trombopoetina regula positivamente a via JAK-STAT, semelhante ao que acontece na mutação JAK2V617F. Com isso, as manifestações clínicas como mieloproliferação de megacariócitos e baixos níveis de hemoglobina contribuem para o fenótipo. Além disso, essa mutação está mais associada a mulheres de idade avançada (CRISTINA, 2018; O'SULLIVAN; HARRISON, 2017).

6.3 CALR

A Calreticulina (CALR) é uma proteína presente no lúmen do retículo endoplasmático, no citoplasma e na superfície celular com diversas funções: sua porção N-terminal ligante de lectina é responsável pela sequência de encaminhamento da proteína até o retículo endoplasmático, sua porção intermediária é rica em prolina, sua porção C-terminal ligante de cálcio é responsável pela sequência de encaminhamento (KDEL) do complexo de Golgi até o retículo endoplasmático e a homeostase do cálcio intracelular (O'SULLIVAN, 2019; SILVA, 2014; LAMAS, 2015). Além disso, CALR também regula vias de sinalização como STAT3, STAT5, AKT, MAPK e FAK, proliferação celular, fagocitose, apoptose e dobramento das glicoproteínas no retículo endoplasmático (RIZVI et al., 2019).

A mutação no gene CALR corresponde de 20 a 25% dos pacientes com Mielofibrose Primária (PALUMBO et al., 2019). A proteína CALR é codificada pelo gene CALR localizada no cromossomo 19 contendo 9 éxons. A mutação mais frequente é denominada tipo 1, onde ocorre uma deleção de 52 pares de base (pb) na posição 367 no éxon 9, que altera a leitura dos nucleotídeos e resulta em um códon de parada 46 aminoácidos depois da deleção (RIZVI et al., 2019; O'SULLIVAN, 2019). Foi visto que esse tipo de mutação estaria mais relacionado a pacientes com Mielofibrose Primária pelo desenvolvimento rápido de trombocitose e mielofibrose (PIETRA et al., 2015).

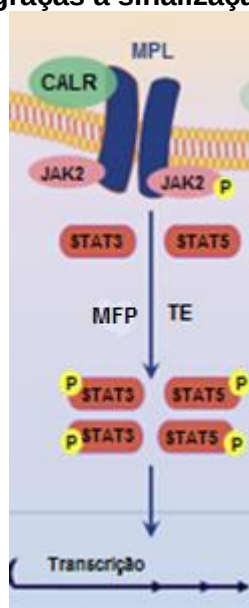
Outra mutação que pode ocorrer nesse mesmo éxon é denominada tipo 2, onde ocorre a inserção de 5 pb (TTGTC) na posição 385 também no éxon 9. Isso também altera a leitura dos nucleotídeos, resultando em um códon de parada 47 aminoácidos após a inserção. Seu prognóstico é semelhante ao fenótipo JAK2V617F (RIZVI et al., 2019; O'SULLIVAN, 2019).

Essas duas mutações no éxon 9 modificam a porção C-terminal da proteína CALR sem modificar sua estrutura primária. Afetam a sequência KDEL e a capacidade de ligação ao cálcio da CALR, diminuindo a exportação de cálcio para o retículo endoplasmático (RIZVI et al., 2019), aumentando seus níveis no citoplasma e desregulando as funções de megacariócitos. O cálcio é importante para diversas sinalizações e regulações celulares de células excitáveis e não excitáveis, assim como

a sua mobilização dos estoques intracelulares e sua entrada em megacariócitos (PIETRA et al., 2015).

Ademais, a CALR mutada tem a capacidade de se ligar e ativar o receptor de trombopoetina (MPL) das células progenitoras da linhagem megacariocítica e, assim, ativar constitutivamente a via JAK-STAT, levando a proliferação e maturação dessas células afetadas (figura 6) (O'SULLIVAN, 2019; RABADE et al., 2018).

Figura 6 – Via JAK-STAT ativada graças a sinalização da CALR-mutada



Fonte: Adaptado de O'SULLIVAN, 2019. A sinalização a partir da interação da trombopoetina e seu receptor MPL acontece normalmente, porém quando há a mutação no gene CALR, a proteína CALR se liga ao receptor e ativa anormalmente a cascata de sinalização JAK-STAT.

A mutação no gene CALR possui manifestações clínicas mais brandas e de melhor sobrevida em comparação com as outras mutações que pacientes com Mielofibrose Primária podem apresentar. Está relacionada à mieloproliferação da linhagem megacariocítica, mielofibrose, maior risco de eventos trombóticos, baixa hemoglobina e glóbulos brancos. Nesse caso, a mutação homozigótica é raramente relatada (RIZVI et al., 2019).

7 MICRO RNAs

Os microRNAs (miRNA) são fragmentos de RNA não codificados em proteínas que têm, como principal função, regular a expressão gênica ligando-se ao RNA mensageiro alvo. São transcritos no núcleo, em unidades transcricionais independentes, ou inseridos em íntrons de genes codificadores de proteínas, e posteriormente, direcionados ao citoplasma para exercer sua função (WEISS, 2017).

Esses fragmentos têm sequências de nucleotídeos específicas para cada sequência alvo dos RNA mensageiros, assim, a regulação pode ser controlada, degradando os RNA mensageiros ou impedindo sua tradução (WEISS, 2017).

Além dos mecanismos conhecidos de regulação por citocinas da hematopoese, há evidências que os miRNA também têm papel na diferenciação e regulação das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas. Alguns miRNA são superexpressos para contribuir para a diferenciação de linfócitos T ou B, outros inibem a apoptose das células-tronco hematopoiéticas, permitindo sua expansão clonal, alguns regulam positiva ou negativamente a transcrição e, outros, ainda têm a capacidade de direcionar a diferenciação das linhagens mieloides para eritrócitos e megacariócitos (ROSSI et al., 2018; RONTAUROLI et al., 2017; BIANCHI et al., 2017).

A desregulação de microRNA durante a hematopoese em pacientes com Mielofibrose Primária trouxe melhor esclarecimento sobre as características clínicas que ocorrem na doença, já que as mutações principais JAK2V617F, MPL W515L ou MPL S505N e CALR podem também acontecer em outras neoplasias, como Policitemia Vera e a Trombocitose Essencial, e desenvolver características clínicas diferentes. Assim, algumas desregulações da expressão de miRNA nas células-tronco hematopoiéticas foram descobertas para elucidar melhor a Mielofibrose Primária (ROSSI et al., 2018; RONTAUROLI et al., 2017; BIANCHI et al., 2017).

7.1 miR-494-3p

O miR-494-3p é responsável por regular positivamente as células-tronco hematopoiéticas de pacientes diagnosticados com Mielofibrose Primária, ou seja, promove a diferenciação e proliferação das células-tronco hematopoiéticas. Na Mielofibrose Primária esse miRNA é superexpresso e, com isso, causa somente a megacariocitopoese, não alterando a proliferação de células de outras linhagens,

agindo tanto nas células progenitoras quanto nas células-tronco hematopoiéticas (RONTAUROLI et al., 2017; BIANCHI et al., 2016).

O alvo do miR-494-3p é o supressor da sinalização de citocina 6 (SOCS6), que faz parte da família de proteínas supressoras da sinalização e exerce a função de regulador negativo na sinalização hematopoiética, ou seja, interfere na via de sinalização feita por receptores, fatores de crescimento, citocinas e tirosinas cinases. Particularmente, a SOCS6 diminui a ativação da via JAK-STAT, principalmente inibindo a STAT3, diminuindo a quantidade de proteínas fosforiladas e a sinalização no núcleo (RONTAUROLI et al., 2017).

A interação miR-494-3p e o RNA mensageiro da SOCS6 faz a inibição da proteína e as vias de sinalização na célula acontecerem normalmente. Contudo, a superexpressão de miR-494-3p promove a inibição excessiva da SOCS6, a ativação da via JAK-STAT e, assim, a proliferação aumentada de megacariócitos (RONTAUROLI et al., 2017).

7.2 miR-382-5p

O miR-382-5p também faz parte dos microRNA responsáveis por regular positivamente as células-tronco hematopoiéticas. Porém, quando desregulado, pode interferir no controle oxidativo das células em pacientes com Mielofibrose Primária e está associado com outras neoplasias hematológicas como a leucemia mieloide aguda promielocítica (LMA-M3) (ROSSI et al., 2018; ZINI et al., 2016).

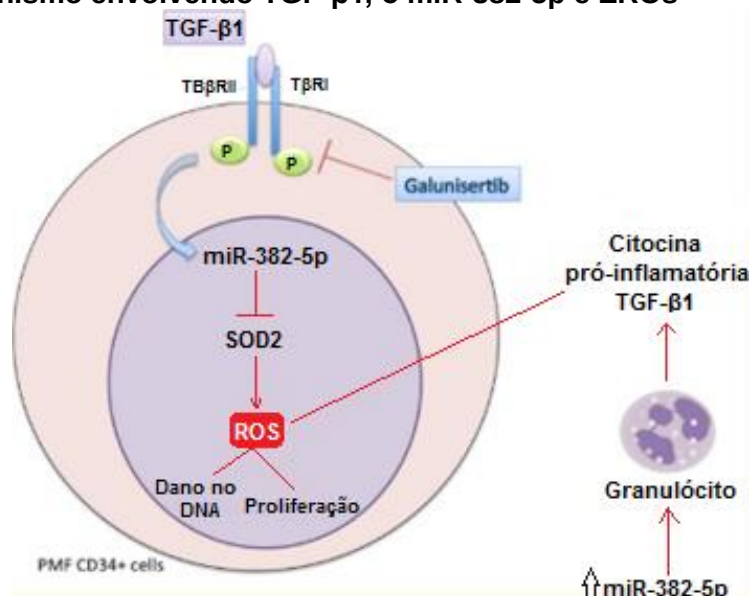
O alvo desse microRNA é o RNA mensageiro da enzima superóxido dismutase (SOD2), responsável por converter as espécies reativas de oxigênio (EROs) em hidróxido de oxigênio (H_2O_2) permitindo assim diminuir os efeitos nocivos e oxidativos que as EROs produzem nas células (ROSSI et al., 2018; ZINI et al., 2016). Já foi visto que as EROs estão significativamente aumentadas nas neoplasias mieloproliferativas, o que pode contribuir para a patogênese das doenças (ROSSI et al., 2018).

Na superexpressão do miR-382-5p em células-tronco hematopoiéticas, observa-se uma diminuição na expressão e na atividade da SOD2, tanto do RNA mensageiro quanto da própria proteína. Isso leva ao acúmulo de EROs, estresse oxidativo na célula, instabilidade no DNA e possível dano genômico, como uma mutação. Além disso, a superexpressão de miR-382-5p também aumenta a

proliferação de células-tronco hematopoiéticas, com ajuda da quantidade excessiva de EROs, principalmente direcionados para a linhagem granulocítica (figura 7) (ROSSI et al., 2018; ZINI et al., 2016).

A característica principal da Mielofibrose Primária é tornar a medula fibrosa no percurso da doença em decorrência da expressão exagerada de citocinas. Uma dessas citocinas é a TGF- β 1, produzida por granulócitos, que nesses pacientes consegue induzir a expressão do miR-382-5p e, consequentemente, diminuir a atividade da SOD2, agravando a doença. Como nos pacientes com Mielofibrose Primária a TGF- β 1 está em grandes quantidades, os resultados seriam uma via de superexpressão para o miR-382-5p (figura 7) (ROSSI et al., 2018; ZINI et al., 2016).

Figura 7 – Mecanismo envolvendo TGF- β 1, o miR-382-5p e EROs



Fonte: Adaptado de ROSSI et al., 2018. As vias de sinalização para a patogênese da Mielofibrose Primária, nesse caso, estariam integradas: a superexpressão do miR-382-5p suprime a enzima SOD2, o que levaria a um aumento na quantidade de EROs, dano oxidativo na célula-tronco hematopoiética, e proliferação celular da linhagem granulocítica. Esses granulócitos criados em excesso expressam citocinas pró-inflamatórias, como TGF- β 1, que prejudicam a medula, levando a fibrose, e induzem a expressão do miR-382-5p.

8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da Mielofibrose Primária incluem anemia, leucocitose, leucopenia, trombocitose, fibrose da medula óssea, eritropoese ineficaz, osteosclerose e hematopoese extramedular, podendo evoluir para um quadro de hepatoesplenomegalia, com possível transformação para leucemia (SHANTZER, 2016). As manifestações clínicas são agravadas quando o paciente é homozigoto para a mutação JAK2V617F, enquanto que, para os heterozigotos, nota-se uma quantidade menor de células no sangue periférico e na medula óssea (MEIRELES, 2014).

A gravidade desses sintomas dependerá do comprometimento da medula óssea em relação a sua fibrose. Por exemplo, é comum observar que a medula levemente fibrosa está associada à anemia leve e sem a ocorrência de esplenomegalia. Já uma medula com grau mais elevado de fibrose está associada à anemia marcada, esplenomegalia, aumento no número de blastos no sangue periférico e plaquetopenia (NAZHA, 2015). No início da doença, quando há ausência de fibrose, a medula se encontra hiper celular, principalmente nas linhagens mieloides. Quando a doença já está instalada, a medula óssea se caracteriza pela hiperplasia de megacariócitos atípicos, com núcleos hipercromáticos, multilobados e núcleos com bordas irregulares. Contudo, na maioria dos casos, a Mielofibrose Primária é assintomática (TEFFERI, 2018b; BIANCHI et al., 2016; MEIRELES, 2014).

8.1 Fibrose medular

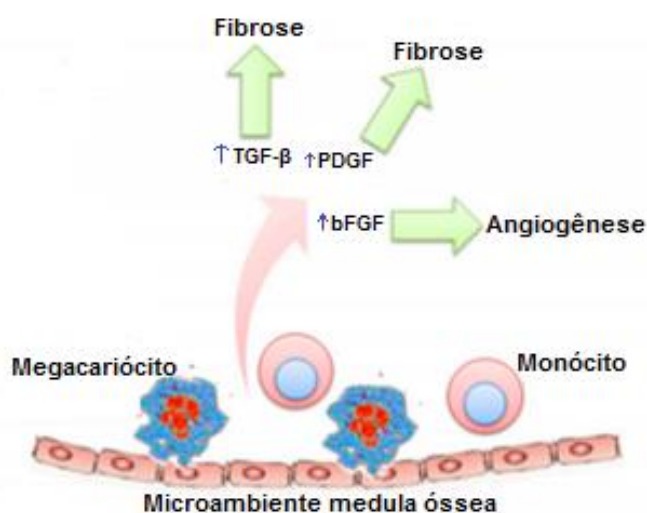
A fibrose medular é um agravante comum na Mielofibrose Primária e é resultado de uma deposição excessiva de colágeno e reticulina derivados da proliferação de fibroblastos e de um desequilíbrio nesse microambiente entre a homeostase e a hematopoese, causado pela hiperproliferação de células mieloides, mais especificamente os monócitos e megacariócitos na medula óssea (BIANCHI et al., 2017; NAZHA et al., 2015).

O aumento no número de monócitos e megacariócitos na medula óssea contribui para a fibrose medular devido à elevada expressão de citocinas, como Interleucinas 6, 2 e 8, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Interferon γ , profibrinogênio, fator de transformação do crescimento β (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto básico (FCFb) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que são liberados pelos megacariócitos e monócitos (BIANCHI et al., 2017;

NAZHA et al., 2015). Além disso, outra citocina é crucial para o aparecimento da fibrose na medula nesses pacientes: o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), um polipeptídeo encontrado em plaquetas com função de regeneração tecidual, sendo o principal componente para o crescimento e proliferação de fibroblasto na medula óssea (NAZHA et al., 2015).

Portanto, a fibrose medular é um fenômeno inflamatório exagerado que afeta células não neoplásicas no microambiente da medula óssea, como esquematizado na figura 8. Essa condição se assemelha às alterações na medula óssea em infecções e exposição a substâncias tóxicas (NAZHA et al., 2015).

Figura 8 – Processo inflamatório na medula óssea que leva a fibrose



Fonte: Adaptado de NAZHA et al., 2015. Monócitos e megacariócitos liberam citocinas inflamatórias na medula óssea, o que leva ao crescimento e proliferação de fibroblastos, fibrose medular e deposição de fibras de colágeno e reticulina.

8.2 Anemia

A anemia é um dos sintomas mais comuns em pacientes com Mielofibrose Primária e um critério importante para se estabelecer o prognóstico do paciente. Causada principalmente pela eritropoiese ineficaz, hematopoese extramedular, devido à proliferação anormal dos precursores da linhagem mieloide e megacariocítica, fibrose medular e possível reação adversa pelos fármacos utilizados para o tratamento. Dependendo do grau de anemia, a ocorrência de leucoeritroblastose no sangue periférico pode acontecer para tentar compensar e melhorar o fornecimento de oxigênio para o organismo (TAKENAKA; SHIMODA; AKASHI, 2018; TEFFERI, 2018b; ARBER et al., 2016).

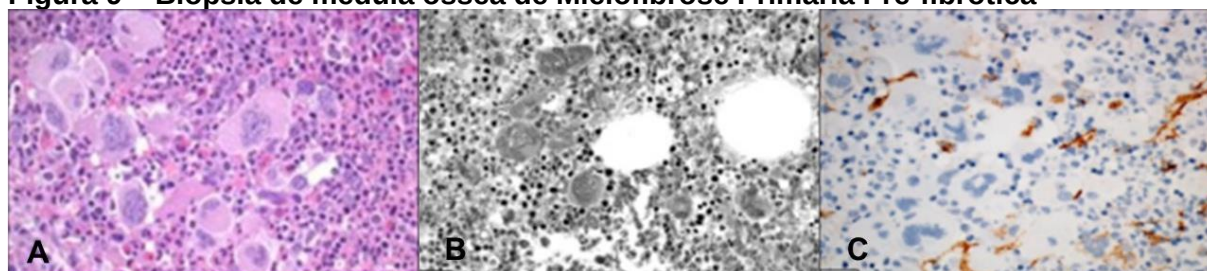
9 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Mielofibrose Primária começa pelos sintomas, como anemia, trombocitose e esplenomegalia, e passa por técnicas mais direcionadas, como a procura por mutações presentes em neoplasias mieloproliferativas e a biópsia de medula óssea, que comumente não gera um bom resultado devido à fibrose (TAKENAKA; SHIMODA; AKASHI, 2018).

A OMS estabeleceu critérios e uma classificação para o consenso e o diagnóstico mais precoce da Mielofibrose Primária. Para isso, a doença é dividida em duas categorias: Mielofibrose Primária pré-fibrótica e Mielofibrose Primária fibrótica.

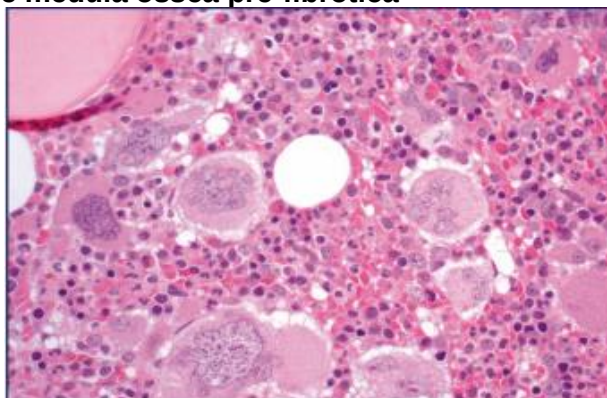
A Mielofibrose Primária pré-fibrótica é caracterizada pelos critérios principais de proliferação atípica de megacariócitos e de granulócitos na medula óssea, diminuição da eritropoiese, ausência de fibrose reticulínica grau 1, hiper celularidade da medula óssea (podendo ser observados nas figuras 9, 10 e 11), presença das mutações JAK2, CALR ou MPL, ou na ausência dessas mutações, a presença de outro marcador clonal. Além disso, a Mielofibrose Primária pré-fibrótica apresenta critérios menores caracterizados por anemia, leucocitose $\geq 11 \times 10^9/\text{dL}$, esplenomegalia palpável e níveis de desidrogenase láctica elevados. Para o diagnóstico, é necessário o paciente apresentar todos os critérios principais e pelo menos 1 critério menor (TAKENAKA; SHIMODA; AKASHI, 2018; ARBER et al., 2016).

Figura 9 – Biopsia de medula óssea de Mielofibrose Primária Pré-fibrótica



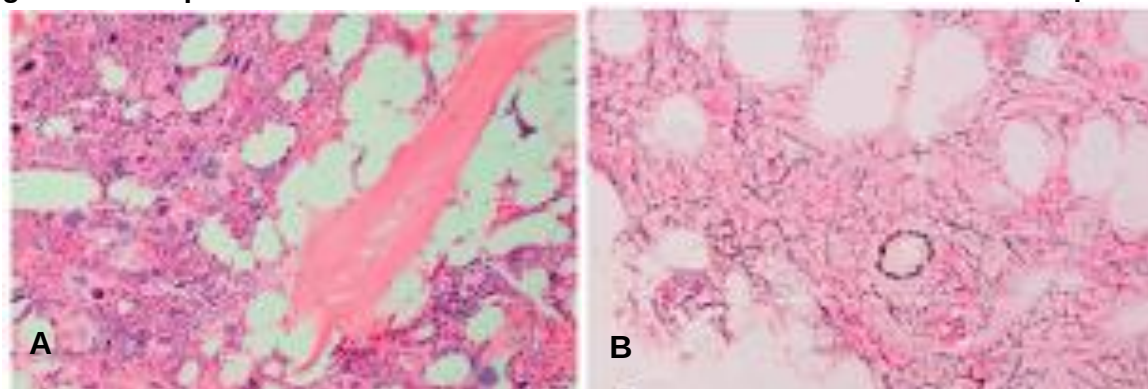
Fonte: RUMI et al., 2018. **A:** Hiper celularidade granulocítica e megacariocítica, com megacariócitos aglomerados e núcleos atípicos (HE, 40x); **B:** Fibras de reticulina (impregnação de prata, 40x); **C:** Células-troncos hematopoiéticas (imunoperoxidase, 40x).

Figura 10 – Biopsia de medula óssea pré-fibrótica



Fonte: RUMI; CAZZOLA, 2016. Biopsia de medula óssea com hiper celularidade granulocítica e megacariocítica atípicas.

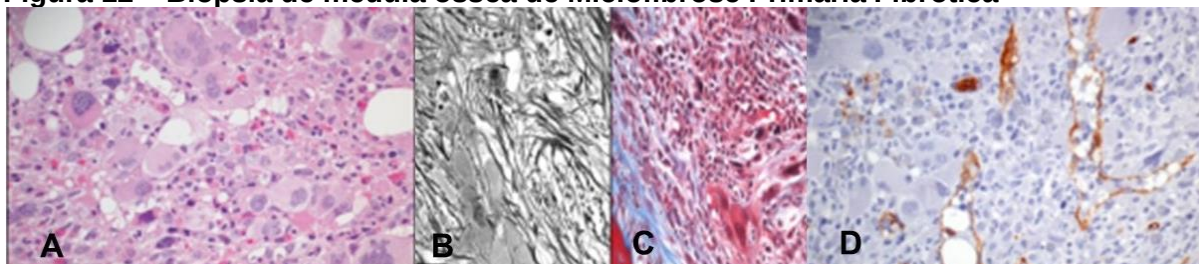
Figura 11 – Biopsia de medula óssea de Mielofibrose Primária com JAK2V617F positivo



Fonte: NAZHA et al., 2015. **A:** Hiper celularidade com megacariócitos atípicos e hematopoeise ao fundo; **B:** Moderada fibrose medular com reticulina.

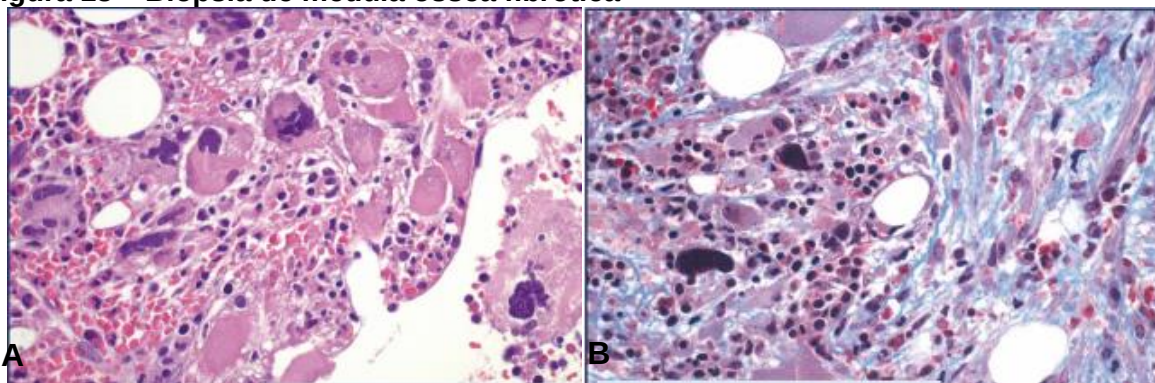
A segunda categoria na classificação da OMS é a Mielofibrose Primária fibrótica, caracterizada pelos critérios principais de proliferação atípica de megacariócitos na medula óssea (observados nas figuras 12, 13 e 15), presença de reticulina na medula óssea e/ou grau de fibrose 2 ou 3 (observada na figura 14), presença das mutações JAK2, CALR ou MPL ou na ausência dessas mutações, a presença de outro marcador clonal e ausência de mielofibrose reativa. Os critérios menores que acompanham essa classificação são anemia, leucocitose $\geq 11 \times 10^9/\text{dL}$, esplenomegalia palpável, níveis de desidrogenase láctica elevados e leucoeritroblastose no sangue periférico, presença de eritrócitos nucleados, dacriócitos (eritrócitos em forma de lágrima) e granulócitos imaturos. Seu diagnóstico também é obtido quando se apresentam todos os critérios principais e pelo menos 1 critério menor (TAKENAKA; SHIMODA; AKASHI, 2018; TEFFERI, 2018b; ARBER et al., 2016).

Figura 12 – Biopsia de medula óssea de Mielofibrose Primária Fibrótica



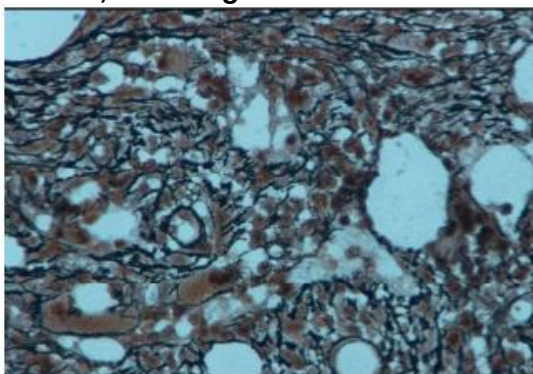
Fonte: RUMI et al., 2018. **A:** Hiper celularidade com megacariócitos aglomerados e núcleos atípicos (HE, 40x); **B:** Fibrose grau 3 (impregnação de prata, 40x); **C:** Fibrose de colágeno grau 2 (coloração Tricrômico Masson, 40x); **D:** Células-troncos (imunoperoxidase, 40x).

Figura 13 – Biopsia de medula óssea fibrótica



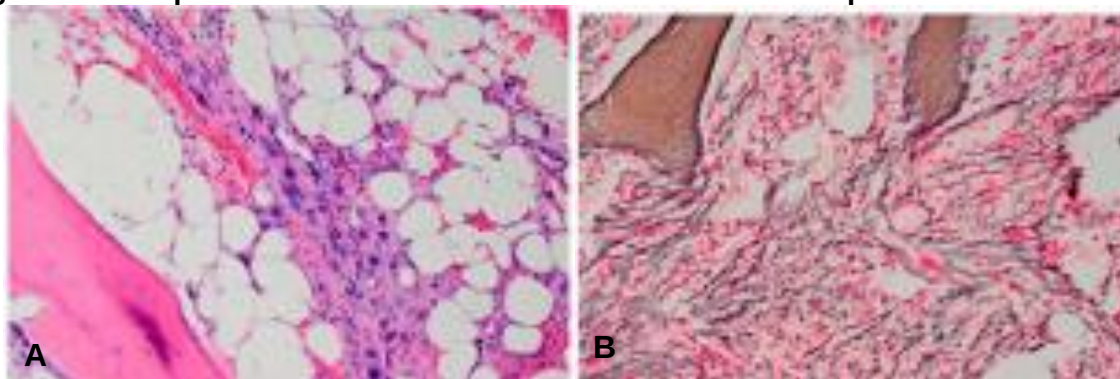
Fonte: RUMI; CAZZOLA, 2016. **A:** Hiper celularidade com megacariócitos atípicos formando aglomerados densos (HE, 40x); **B:** Fibras de colágeno, fibrose (coloração Tricrômica de Masson, 40x).

Figura 14 – Fibras de reticulina, fibrose grau 2



Fonte: RIZVI et al., 2019

Figura 15 – Biopsia de medula óssea fibrótica com JAK2V617F positivo



Fonte: NAZHA et al., 2015. **A:** Aglomerados de megacariócitos atípicos com redução na hematopoiese no fundo; **B:** Fibrose medular grave com reticulina.

Ademais, a OMS também classificou a fibrose em graus para observar a gravidade do comprometimento da medula óssea no paciente e seu possível prognóstico, ilustrados na tabela 2.

Tabela 2: Classificação OMS do grau de fibrose medular

Classificação	Características
MF-0	Medula apresenta reticulina linear dispersa correspondente a medula óssea normal
MF-1	Medula apresenta uma rede solta de reticulina com cruzamentos
MF-2	Medula apresenta um aumento difuso e denso da reticulina
	Feixes focais de fibras espessas compatíveis com colágeno e/ou osteoesclerose focal
MF-3	Medula apresenta um aumento difuso e denso de reticulina
	Feixes grosseiros de fibras grossas consistente com colágeno e associadas a osteoesclerose

Fonte: TAKENAKA; SHIMODA; AKASHI, 2018; ARBER et al., 2016

9.1 Diagnóstico molecular

Ainda não totalmente difundida na prática diagnóstica da Mielofibrose Primária, a biologia molecular traz uma confirmação das mutações nas células progenitoras, tanto na medula como no sangue periférico, e juntamente com o diagnóstico clínico permite ou não confirmar o diagnóstico (SCHUBERT et al., 2019).

9.1.1 Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

Um das primeiras técnicas moleculares, chamada PCR convencional, permite amplificar fragmentos de DNA e, posteriormente observar o tamanho do produto gerado e identificá-lo. A técnica consiste em 3 etapas principais, onde, a partir de um único fragmento de DNA molde é possível obter milhares de sequências idênticas, também chamadas de produto de PCR. A primeira etapa consiste na desnaturação da fita dupla do DNA molde, a segunda etapa, o alinhamento dos primers em região específica de interesse e, a terceira etapa, a amplificação. Essa reação é feita em um termociclador e as etapas se repetem de 25 a 45 vezes, nos chamados ciclos (HAAS; TORRES, 2016).

No estudo de Frawley e colaboradores (2018), a partir da amostra de sangue total, foi purificado o DNA de granulócitos, e os *primers* desenvolvidos foram específicos para os *hotspots* das mutações JAK2 éxon 14, JAK2 éxon 12, MPL éxon 10 e CALR éxon 9, cujas sequências estão descritas na tabela 3. O protocolo de ciclagem utilizado foi: desnaturação da fita dupla do DNA a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos primers de 52°C a 65°C por 45 segundos, extensão da fita a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos (FRAWLEY et al., 2018).

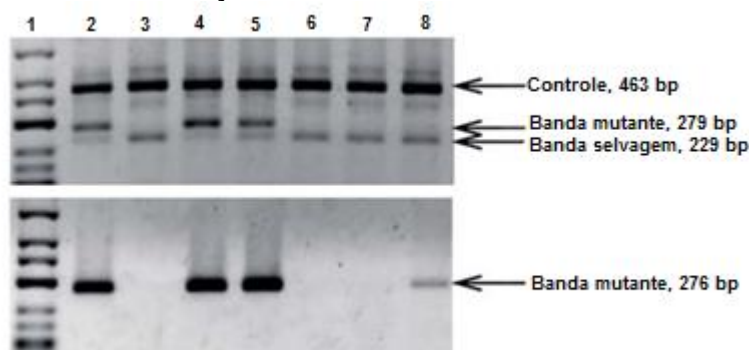
Tabela 3 – Primers das mutações utilizados no PCR

Mutação	Primers	Pares de base
JAK2 éxon 14	Primer 5' TGATGAGCAAGCTTTCTCACA Primer 3' ACCTAGCTGTGATCCTGAAACT	155
JAK2 éxon 12	Primer 5' TCACCAACATTACAGAGGCCT Primer 3' TTTTGCTAACATCTAACACAAGGT	246
MPL éxon 10	Primer 5' GTGACCGCTCTGCATCTAGT Primer 3' GCGAACCAAGAATGCCTGTT	161
CALR éxon 9	Primer 5' AGGACAAACAGGACGAGGAG Primer 3' TCTCTACAGCTCGTCCTTGG	185

Fonte: FRAWLEY et al., 2018

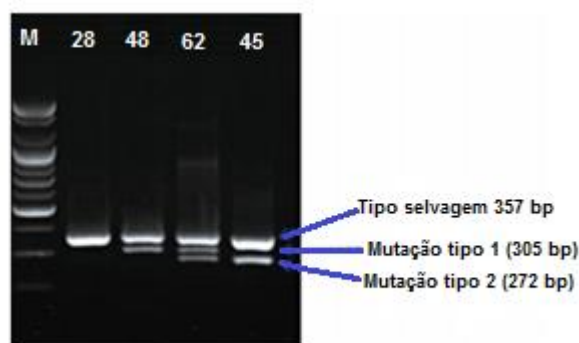
Em seguida, os produtos amplificados do PCR foram submetidos à eletroforese no gel de agarose de alta resolução e os resultados podem ser visualizados nas figuras 16 e 17 (FRAWLEY et al., 2018).

Figura 16 – Eletroforese da mutação JAK2 éxon 12



Fonte: Adaptado de LESZCZYNSKA et al., 2016. Nesse resultado de eletroforese podemos observar que os pacientes 2, 4, 5 e 8 são positivos para a mutação, correspondendo a visualização da banda 279 bp. Já os pacientes 3, 6 e 7 são negativos para a mutação, correspondendo a visualização da banda 229 bp.

Figura 17 – Eletroforese da mutação CALR tipo 1 e tipo 2



Fonte: Adaptado de JEONG et al., 2016. Essa eletroforese indicou que o paciente 28 é negativo e homozigoto para a mutação, visto a visualização da banda 357 bp. Já o paciente 48 é positivo e heterozigoto para a mutação tipo 1, visto a visualização na banda 357 bp e 305 bp. E o paciente 62 é positivo e heterozigoto para a mutação tipo 1 e tipo 2, visto a visualização na banda 357 bp, 305 bp e 272 bp. Por último, o paciente 45 é positivo e heterozigoto para a mutação tipo 2, visto a visualização na banda 357 bp e 272 bp.

9.1.2 PCR Tempo Real (qPCR)

Umas das técnicas moleculares quantitativas mais modernas, o qPCR permite obter os resultados da amplificação em curto período, além de ser um método sensível e eficiente, sem a necessidade de realização da eletroforese em gel de agarose. O diferencial dessa técnica é a utilização da fluorescência para detectar os produtos de PCR durante a fase exponencial da amplificação. Há dois principais sistemas utilizados: SYBR Green, que utiliza um corante que incorpora na fita dupla de DNA e TaqMan, que utiliza uma sonda acoplados um fluoróforo e um *quencher*. A quantificação dos produtos de PCR se dá pela quantificação relativa e quantificação absoluta, que necessita de uma curva de concentrações conhecidas (HAAS; TORRES, 2016).

Já que a mutação JAK2V617F é a mutação mais comum na Mielofibrose Primária e nas neoplasias mieloproliferativas em geral, o diagnóstico necessita ser rápido e preciso para que uma intervenção terapêutica possa ser realizada. Por isso, a tecnologia do PCR Tempo Real é utilizada para essa mutação (ZHAO et al., 2016).

As amostras podem ser tanto de sangue periférico quanto de medula óssea para realizar o qPCR, cuja exemplos de primers estão nas tabelas 4 e 5 (SCHUBERT et al., 2019; ZHAO et al., 2016).

Tabela 4 – Primer de qPCR utilizando o sistema de TaqMan

Primer mutação	5'-VIC-AATTATGGAGTATGTTTCTGTGGA-3'
Primer selvagem	5'-FAM-TAAATTATGGAGTATGTGTCTGT-3'

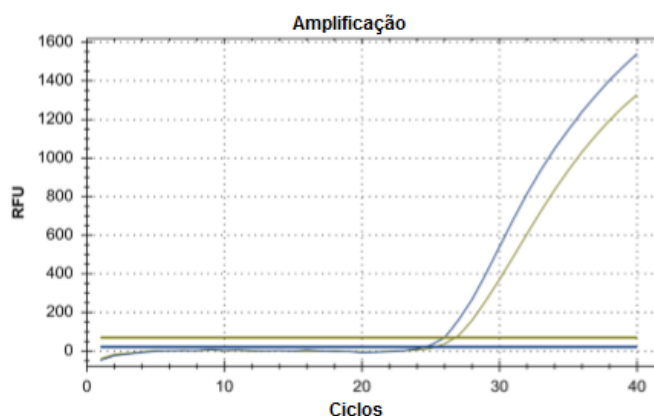
Fonte: ZHAO et al., 2016. VIC e FAM são os forofóros.

Tabela 5 – Primer de qPCR utilizando o sistema de SYBR Green

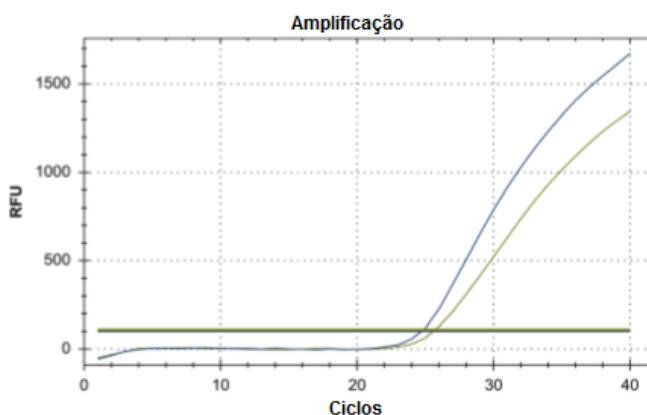
Primer Forward	5'-GCAGCAAGCATGATGAGTC-3'
Primer Reverse	5'-CAACTGCTTAGCCACTCCA-3'

Fonte: AKADA et al., 2010

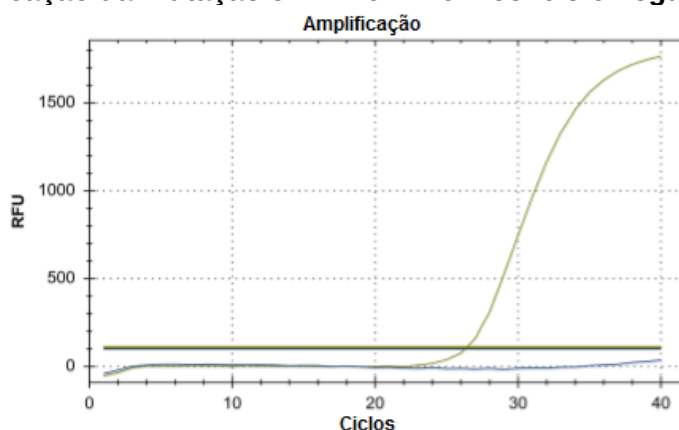
O resultado da amplificação do PCR é visualizado em gráficos, onde o eixo X representa os ciclos do PCR e o eixo Y representa a intensidade da fluorescência, exemplificados nas figuras 18, 19 e 20. Pela análise dos gráficos, é possível inferir que quanto maior a quantidade de DNA molde, menos ciclos são necessários para iniciar a detecção do DNA amplificado (HAAS; TORRES, 2016).

Figura 18 – Amplificação da mutação JAK2V617F em paciente

Fonte: FAN et al., 2018. Como podemos observar ocorreu a amplificação, devido ao aparecimento da linha exponencial azul, constatando que este paciente apresenta a mutação JAK2V617F.

Figura 19 – Amplificação da mutação JAK2V617F em controle positivo

Fonte: FAN et al., 2018. Sendo o controle positivo a amplificação do gene da mutação JAK2V617F ocorreu, devido ao aparecimento da linha exponencial azul.

Figura 20 – Amplificação da mutação JAK2V617F em controle negativo

Fonte: FAN et al., 2018. Sendo o controle negativo a amplificação do gene da mutação JAK2V617F não ocorreu, devido ao não aparecimento da linha exponencial azul e do aparecimento somente da linha exponencial verde (corresponde ao gene EZH2 tipo selvagem, sendo esse um controle negativo).

9.1.3 PCR Multiplex Alelo Específico

Técnica que utiliza primers específicos diferentes, que se anelam em regiões distintas do mesmo gene ou genes diferentes, permitindo a análise simultânea de diversos fragmentos de DNA em uma mesma amostra. É utilizada para detecção de mutações pontuais, com primers alelo específicos para o gene normal e para cada manifestação mutacional que a doença pode conferir (HAAS; TORRES, 2016).

Já que a mutação no gene do receptor da trombopoetina pode se apresentar de duas formas, MPL W515L ou MPL S505N no éxon 10, o método molecular viável é o PCR multiplex alelo específico. Na tabela 6 estão os primers alelo específicos utilizados (FURTADO et al., 2013).

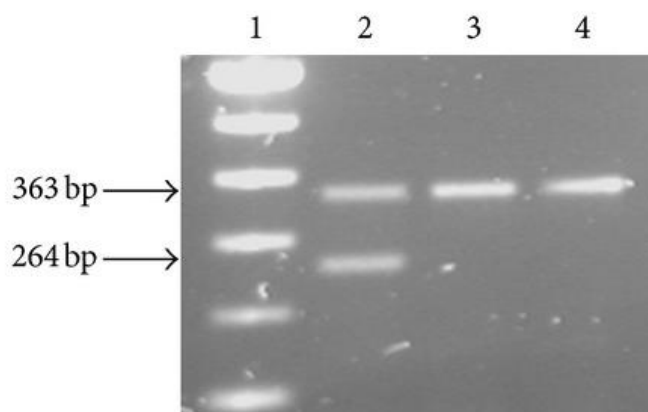
Tabela 6 – Primers de PCR multiplex alelo específico

Gene	Primer
MPL (Forward)	5' TGGGCCGAAGTCTGACCCTTT 3'
MPL (Reverse)	5' CAGAGCGAACCAAGAATGCCTGT 3'
W515L (Forward)	5' GGCCTGCTGCTGCTGAGAT T 3'
S505N (Reverse)	5' CAGGCCCGAGGACGGCG T 3'

Fonte: FURTADO et al., 2013

Após o PCR, os fragmentos amplificados são submetidos à eletroforese e o resultado pode ser visualizado na figura 21.

Figura 21 – Eletroforese de amostras para a pesquisa do fenótipo S505N

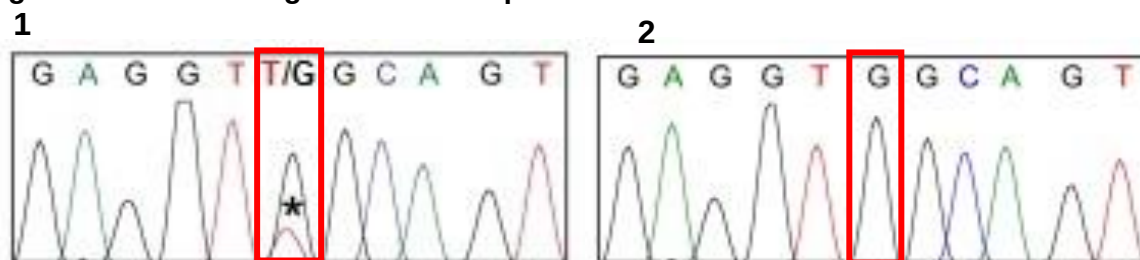


Fonte: MORRELL et al., 2013. Nesse caso a coluna 1 representa o controle, onde a banda 363bp é o gene MPL selvagem e a banda 264bp é o fenótipo S505N. Na coluna 2 a amostra foi o sangue periférico, positiva para a mutação. Na coluna 3 a amostra foi uma raspagem bucal, negativa para a mutação. E na coluna 4 a amostra foi isolado de células T, também negativas para a mutação. A não apresentação da mutação em outras células e amostras pode ser explicada pelo fato da mutação ser adquirida e não de origem germinativa.

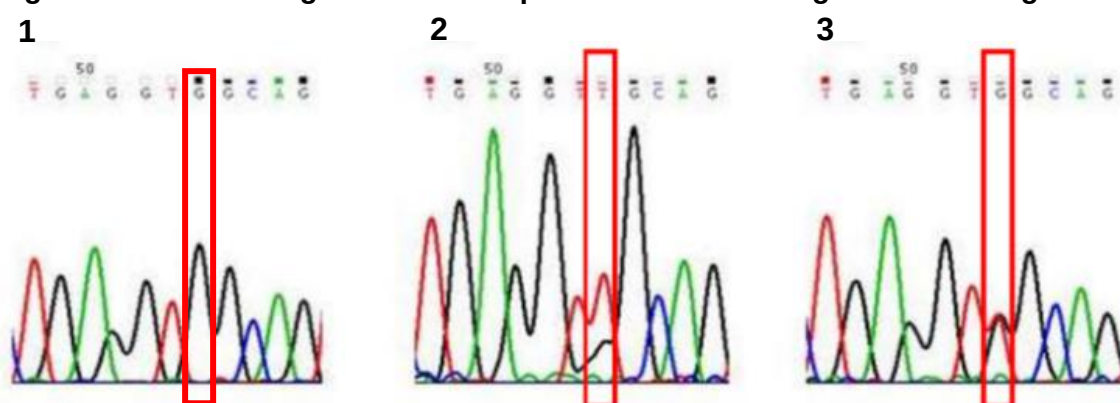
9.1.4 Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento de DNA consiste basicamente na determinação da sequência de bases de nucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina) em um gene específico. As etapas do sequenciamento são semelhantes ao do PCR, com a adição de dideoxicleotídeo, que são nucleotídeos sem o grupo hidroxila na posição 3' do carbono e marcados com fluoróforo (cada base com um fluoróforo diferente). Esse processo se repete em vários ciclos, garantindo que há fitas de tamanhos diferentes e dideoxinucleotídeos em todas as posições, para que na fase da eletroforese capilar um laser possa identificar o fluoróforo dos fragmentos e a sequência do DNA (KRIS WETTERSTRAND, 2019)

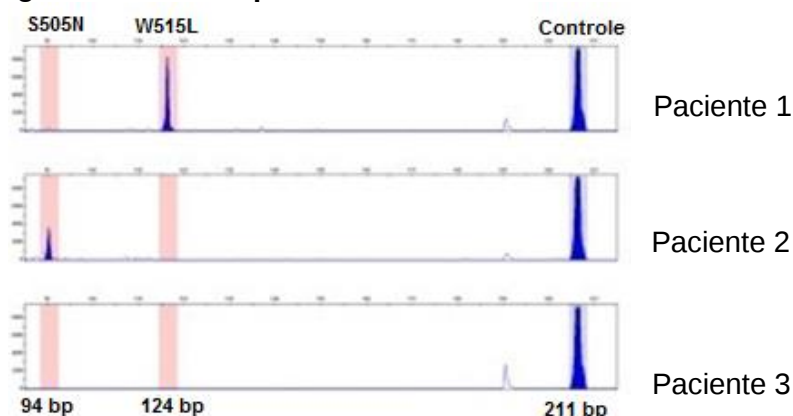
Após a utilização do PCR para isolar e purificar o gene MPL também é possível fazer o sequenciamento de Sanger, para visualizar o resultado da amplificação. Alguns possíveis resultados são mostrados nas figuras 22, 23, 24. No caso da mutação derivada da troca de um triptofano por uma lisina no códon 515, a alteração pontual que ocorre entre as bases nitrogenadas é a substituição de uma guanina por uma timina (TGG → TTG), e pode-se observar no eletroferograma (FURTADO et al., 2013).

Figura 22 – Eletroferograma do fenótipo W515L

Fonte: Adaptado de FURTADO et al., 2013. O eletroferograma 1 é positivo para a mutação, pois se trata de uma heterozigose, onde é possível observar a ocorrência tanto da timina quanto da guanina. O eletroferograma 2 é negativo para a mutação.

Figura 23 – Eletroferograma do fenótipo W515L de homozigoto e heterozigoto

Fonte: SILVA, 2014. O eletroferograma 1 é negativo para a mutação. Já o eletroferograma 2 é positivo, sendo homozigótico, ocorrendo uma maior manifestação da timina sobre a guanina. E o eletroferograma 3 é positivo para a mutação, sendo heterozigótico.

Figura 24 – Eletroferograma dos fenótipos MPL

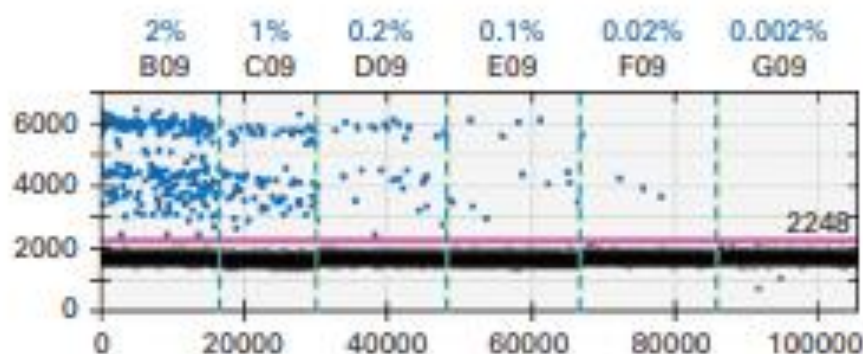
Fonte: Adaptado de FURTADO et al., 2013. Mutação MPL de fenótipo W515L no paciente 1, mutação MPL de fenótipo S505N no paciente 2 e tipo selvagem no paciente 3.

No caso da detecção da mutação CALR, também pode ser utilizado o sequenciamento de Sanger, justamente para observar a sequência e comprovar se há alguma deleção ou inserção no éxon (RABADE et al., 2018).

Primeiramente é feita a extração de DNA, geralmente de granulócitos do sangue periférico, e é amplificado o gene de interesse, o éxon 9, utilizando o método

Assim como os outros métodos, a amostra é de sangue periférico, isolando DNA genômico dos leucócitos. Um exemplo de protocolo utilizado para detecção do gene CALR é inicialmente a incubação do DNA genômico por 2 minutos a 50°C e 10 minutos por 95°C. Na fase de amplificação, repetem-se 50 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 60°C por 60 segundos (LINK-LENCZOWSKA et al., 2018), sendo um exemplo de resultado mostrado na figura 26.

Figura 26 – Amplificação do gene CALR tipo 2



Fonte: A BADBARAN et al., 2016. A amplificação positiva pode ser observada pelos pontos azuis no gráfico. A linha rosa é o limite de detecção e os pontos em preto são a amplificação negativa, onde não há nenhum gene alvo. O eixo X corresponde ao grau de diluição, onde se pode observar que o gene CALR tipo 2 é detectado mesmo em concentrações diluídas baixas. E o eixo Y indica a amplitude fluorescente da amostra.

9.1.6 qPCR X Sanger X dPCR

Cada técnica apresentada tem suas particularidades e especificidades, assim como precisão, sensibilidade e alvo molecular específico. Tratam-se de técnicas não invasivas que podem ser utilizadas para diagnóstico, avaliação da resposta ao tratamento utilizado, acompanhamento do prognóstico e monitoramento do transplante de célula-tronco alogênica. Essas técnicas têm em comum a capacidade de reproduzirem milhões de cópias simultaneamente a partir de um molde. Contudo, algumas vantagens e desvantagens de cada técnica, listadas nas tabelas 7 e 8 respectivamente, são importantes para serem levadas em consideração na hora da escolha de qual método utilizar, a fim de reproduzir o melhor e mais preciso resultado (SCHERER et al., 2017).

Tabela 7 – Vantagens de cada técnica

qPCR	Sequenciamento de Sanger	dPCR
Alta sensibilidade	Detecção de mutações conhecidas e desconhecidas	Alta sensibilidade
Boa reprodutibilidade	Padronizado em algumas aplicações (como detecção de mutação de resistência em LMC)	Quantitativo
Detecção de mutações conhecidas		Detecção de mutações conhecidas
Detecção de mutações pontuais		Detecção de mutações pontuais
Sem necessidade de pós-processamento		Genotipagem rápida
Padronizado em algumas aplicações (detecção de inumoglobulina em LLA)		Monitoramento de tratamento
		Necessita de pouca amostra
Possível combinar com RT-PCR e Multiplex		

Fonte: PALUMBO et al., 2019; SCHERER et al., 2017; LANGABEER; HASLAM; CONNEALLY, 2014.

Tabela 8 – Desvantagens de cada técnica

qPCR	Sequenciamento de Sanger	dPCR
Necessita de muita amostra	Necessita de muita amostra	Rastreamento limitado de múltiplos genes de amostras
Número limitado de mutações testadas	Número limitado de mutações testadas	
Otimização individual dos parâmetros das reações	Otimização individual dos parâmetros das reações	Otimização individual dos parâmetros das reações
Padronização limitada	Sensibilidade limitada	Número limitado de mutações testadas
	Necessita de pós-processamento	Padronização limitada

Fonte: PALUMBO et al., 2019; SCHERER et al., 2017; LANGABEER; HASLAM; CONNEALLY, 2014.

9.2 Cariótipo

É comum, dentre os exames para diagnosticar a Mielofibrose Primária, o paciente fazer o exame de cariótipo, pois aproximadamente 50-60% dos pacientes com Mielofibrose Primária têm alguma alteração de cariótipo que pode favorecer ou reduzir a progressão da doença, alterando seu prognóstico (TEFFERI, 2018a; COOPER; SCOTT, 2018; PENNA et al., 2018).

O MIPSS70 (Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional por Mutação), GIPSS (Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional por Genética) e várias análises de pacientes com Mielofibrose Primária nos Estados Unidos e na Europa classificaram os cariótipos mais frequentes na doença. Estes são divididos em 3 categorias de acordo com o risco citogenético do prognóstico: cariótipo favorável, desfavorável e cariótipo de muito alto risco (PENNA et al., 2018; COOPER; SCOTT, 2018). Além disso, cada categoria de cariótipo também diz respeito à sobrevida do paciente e à possibilidade de transformação leucêmica (COOPER; SCOTT, 2018), como observados na tabela 11.

O cariótipo desfavorável inclui as anomalias de cariótipo complexo, +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q, 12p-, inv(3), rearranjo 11q23 (BEAUVERD et al., 2016). O cariótipo favorável inclui del(20q), del(13q), trissomia do 9 e alterações no cromossomo 1 (PAULA JUNIOR, 2018). O cariótipo de muito alto risco inclui isocromossomia do 17q e 12p, monossomia do cromossomo 7 e 11q23 e trissomia do cromossomo 19 (TEFFERI, 2018a).

10 PROGNÓSTICO

Já que a Mielofibrose Primária pode evoluir para a leucemia, é importante primeiramente obter um diagnóstico correto dentre as outras neoplasias mieloproliferativas e, posteriormente, definir o tratamento e o prognóstico. Para tanto é necessário um sistema que relacione o diagnóstico clínico do paciente com seu prognóstico para melhor intervenção terapêutica (TEFFERI, 2018b).

Assim, em 2009, foi criado o Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional (IPSS) para Mielofibrose Primária, baseado em vários estudos feitos nos centros de pesquisas da Europa e Estados Unidos. Esse sistema se aplica no momento do diagnóstico e estabelece 5 critérios: idade do paciente maior que 65 anos, hemoglobina < 10g/dL, leucócitos > $25 \times 10^9/L$, blastos no sangue periférico $\geq 1\%$ e presença de sintomas constitucionais (fadiga, sudorese noturna e febre, por exemplo) (TEFFERI, 2018b; BENITES et al., 2013).

Como podemos observar na tabela 9, de acordo com a ocorrência clínica do paciente, são atribuídas pontuações que refletirão diretamente no prognóstico, relacionadas ao risco e ao estágio da doença em que o paciente se encontra, assim como a sobrevida média (TEFFERI, 2018b; NUNES, 2015; BENITES et al., 2013).

Tabela 9 – Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional

Critérios	Pontuação	Prognóstico	Sobrevida
idade > 65 anos		0 ponto: Baixo	11 a 15 anos
hemoglobina < 10g/dL	1	1 ponto: Intermediário 1	6,5 a 8 anos
leucócitos > $25 \times 10^9/L$	1	2 pontos: Intermediário 2	3 a 4 anos
blastos $\geq 1\%$	1	≥ 3 : Alto	1 a 2,5 anos
sintomas constitucionais	1		

Fonte: TEFFERI, 2018b; NUNES, 2015; BENITES et al., 2013

Contudo, com novas descobertas sobre a doença, diagnóstico e avanços moleculares, um novo sistema de pontuação foi estabelecido para ilustrar melhor a patogênese da Mielofibrose Primária e assim estabelecer o tratamento e prognóstico adequados. Para isso, foi criado o Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional por Mutação (MIPSS70) e o Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional por Genética (GIPSS), que levam em consideração as mutações, cariótipos, hemoglobina

relacionada a cada sexo e outras alterações genéticas presentes da doença (TEFFERI, 2018b).

O MIPSS70 foi desenvolvido para pacientes com 70 anos ou menos e para aqueles que foram transplantados. Estabelece critérios genéticos como ausência da mutação CALR tipo 1, presença de uma ou duas mutações de alto risco molecular (outro marcador clonal que não seja JAK2V617F, MPL W515L ou MPL S505N e CALR), presença do cariótipo de risco muito alto e o cariótipo desfavorável. Já os critérios clínicos compreendem anemia grave (hemoglobina < 8g/dL para mulheres e < 9g/dL para homens), anemia moderada (hemoglobina de 8g/dL a 9,9g/dL para mulheres e 9g/dL a 10,9g/dL para homens), leucócitos > $25 \times 10^9/L$, blastos no sangue periférico $\geq 2\%$, plaquetas < $100 \times 10^9/L$, grau de fibrose > 2 e presença de sintomas constitucionais (TEFFERI, 2018b).

O GIPSS leva em consideração somente mutações e cariótipos, não estabelecendo critérios clínicos, como a presença do cariótipo de risco muito alto, o cariótipo desfavorável e a ausência da mutação CALR tipo 1 (TEFFERI, 2018b).

Os dois sistemas também irão relacionar esses critérios com pontuações e estabelecer para cada risco na progressão da doença, no prognóstico e sobrevida específicos (TEFFERI, 2018b), como observados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional por Mutação

Crítérios	Pontuação	Prognóstico	Sobrevida
cariótipo de risco muito alto	4	0 pontos: Muito baixo	
cariótipo desfavorável	3	1 a 2 pontos: Baixo	16,5 anos
1 mutação de alto risco molecular	2	3 a 4 pontos: Intermediário	8 anos
≥ 2 mutações de alto risco molecular	3	≥ 5 pontos: Alto	4 anos
ausência mutação CALR tipo 1	2	≥ 9 pontos: Muito alto	2 anos
Anemia grave	2		
Anemia moderada	1		
blastos $\geq 2\%$	1		
sintomas constitucionais	2		

Fonte: TEFFERI, 2018b

Tabela 11 – Sistema Prognóstico de Pontuação Internacional por Genética

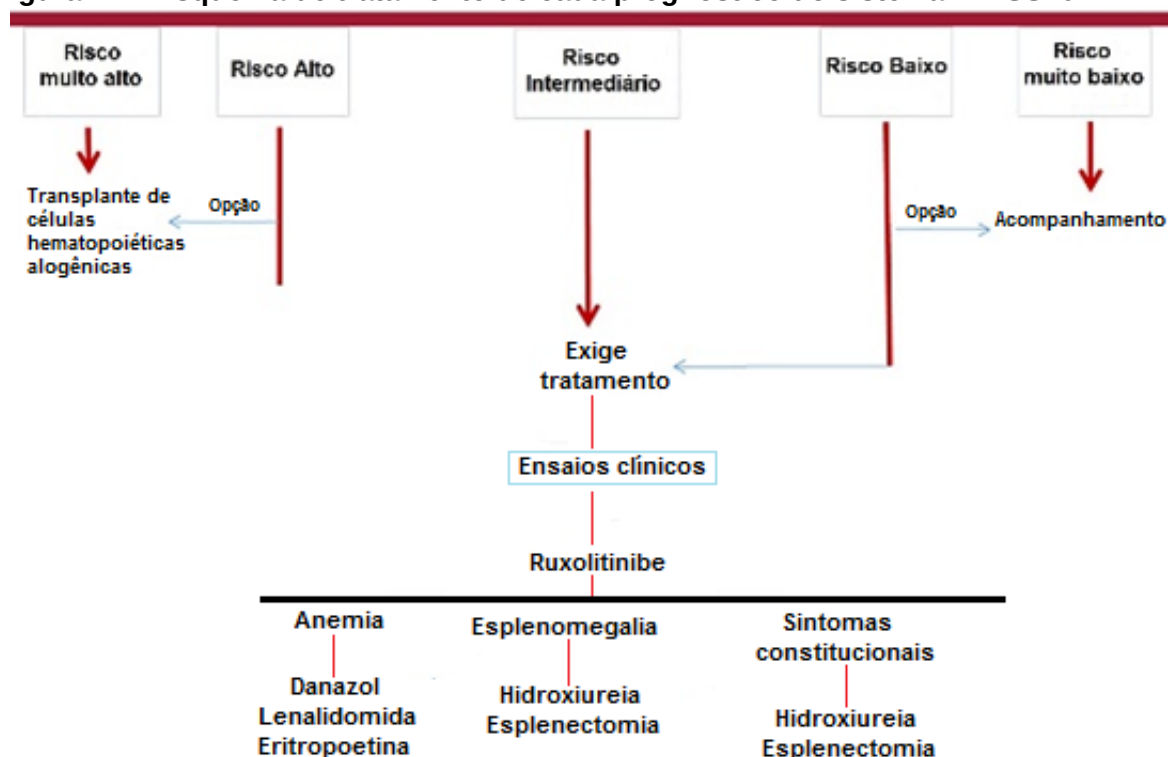
Critérios	Pontuação	Prognóstico	Sobrevida
cariótipo de risco muito alto	2	0 pontos: Baixo	26,5 anos
cariótipo desfavorável	1	1 ponto: Intermediário 1	8 anos
ausência mutação CALR tipo 1	1	2 pontos: Intermediário 2	4 anos
		≥ 3 pontos: Alto	2 anos

Fonte: TEFFERI, 2018b

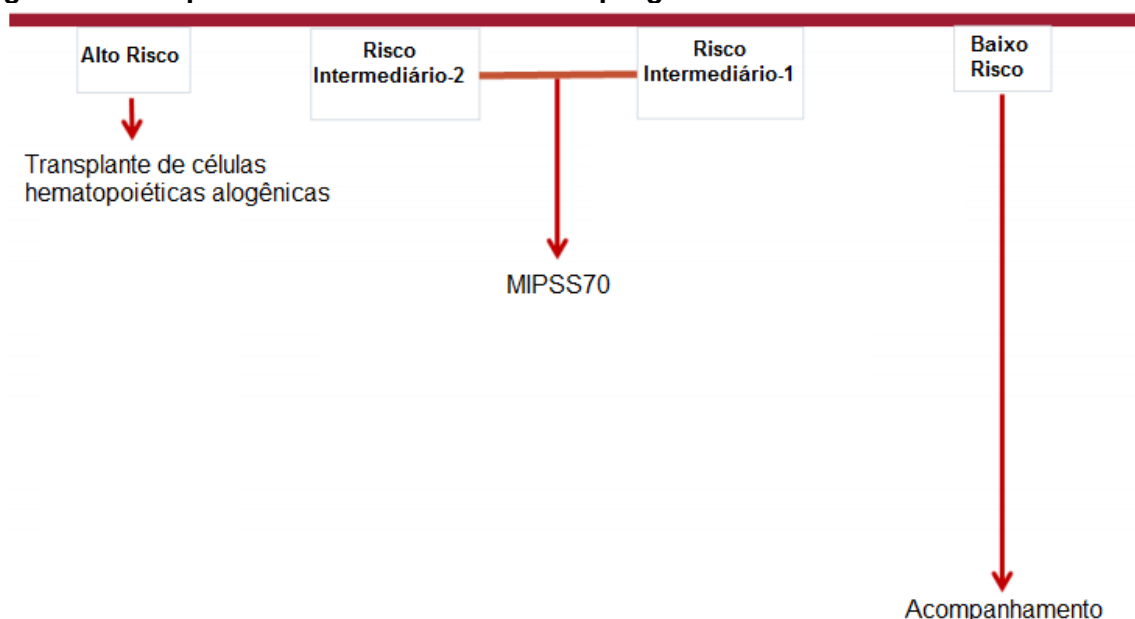
11 TRATAMENTO

Os tratamentos para a Mielofibrose Primária são limitados, porém, com o avanço da tecnologia e da biologia molecular, tornou-se possível a aplicação de tratamentos mais específicos e individualizados, com alvos genéticos, como é o caso da terapia gênica. O tratamento visa diminuir a ocorrência de sintomas, tanto clínicos como genéticos, melhorar a qualidade de vida do paciente, aumentando seu prognóstico e reduzir as chances da transformação para leucemia (O'SULLIVAN; HARRISON, 2018). Os mais utilizados incluem agentes estimuladores da eritropoiese (AEEs), andrógenos, agentes imunomoduladores (IMiDs) e drogas citorredutoras (STAHL; ZEIDAN, 2017) e são observados nas figuras 27 e 28.

Figura 27 – Esquema de tratamento de cada prognóstico do sistema MIPSS70



Fonte: Adaptado de TEFFERI, 2018b. Observa-se que o acompanhamento nos prognósticos muito baixo ou baixo é um esquema de tratamento aceitável, já que esses pacientes são assintomáticos. No caso do risco intermediário são fornecidas opções como participação de ensaios clínicos ou terapia convencional com o Ruxolitinibe e outros para tratar os sintomas. E os prognósticos de risco muito alto e alto o mais recomendável é o transplante de células hematopoiéticas alogênicas.

Figura 28 – Esquema de tratamento de cada prognóstico do sistema GIPSS

Fonte: Adaptado de TEFFERI, 2018b. Na classificação GIPSS o prognóstico muito baixo corresponde ao risco baixo e muito baixo da classificação MIPSS70. Já o prognóstico alto na GIPSS corresponde ao risco alto e muito alto da MIPSS70. E os prognósticos intermediário 1 e 2 na GIPSS corresponde ao risco intermediário da MIPSS70. Portanto as recomendações de tratamento são as mesmas.

11.1 Inibidores de JAK

O Ruxolitinibe é o principal e o primeiro fármaco representante da classe dos inibidores JAK para o tratamento de Mielofibrose Primária aprovado pela ANVISA, em 2015, e pela FDA (agência sanitária americana, Food and Drug Administration), em 2011 (JAIN; MESA; PALMER, 2017). Sendo um inibidor seletivo das JAK1 e JAK2, Ruxolitinibe, bloqueia a atividade dessas proteínas, ou seja, bloqueia a fosforilação da STAT e, assim, diminui a produção de progenitores sanguíneos extramedulares. Mostra-se eficaz para os principais fenótipos, JAK2V617F, MPL W515L, MPL S505N e CALR, pois mesmo com a ativação espontânea da via JAK-STAT que essas mutações produzem, o Ruxolitinibe consegue prejudicar a diferenciação da célula-tronco hematopoiética e diminuir sua produção (BYRNE; SAVANI; SAVONA, 2018; JAKAVI, 2015).

Contudo, o Ruxolitinibe não consegue reverter a fibrose da medula óssea ou impedir que aconteça, não tem atividade antitumoral nem induz a remissão citogenética e molecular (TEFFERI, 2018b).

É importante ressaltar que essa inibição não prejudica os níveis basais das células progenitoras hematopoiéticas, pois a inibição máxima do JAK1 e JAK2 foi

observada somente após 2 horas da administração do medicamento. Em 8 horas, os níveis retornaram ao valor basal, ou seja, o Ruxolitinibe evita a produção espontânea e exagerada das células progenitoras hematopoiéticas (JAKAVI, 2015).

Além de atuar como inibidor seletivo das JAK1 e JAK2, o fármaco também tem a capacidade de diminuir a esplenomegalia, fator importante e decisivo que a FDA encontrou para aprová-lo nos ensaios clínicos (JAIN; MESA; PALMER, 2017), a trombocitopenia, pois diminui a hiperplasia da linhagem megacariocítica que a doença pode provocar, e os níveis de citocinas como TNF- α e Interleucina 6, assim como neutropenia (SAEED; MCLORNAN; HARRISON, 2017; JAKAVI, 2015).

Como qualquer fármaco, Ruxolitinibe também apresenta efeitos colaterais, como a anemia, efeito mais comum, podendo apresentar níveis de hemoglobina menores que 8g/L. Por isso, um hemograma completo feito periodicamente é recomendável, já que o tratamento com Ruxolitinibe é de uso crônico (SAEED; MCLORNAN; HARRISON, 2017; JAKAVI, 2015).

O Pacritinibe é um inibidor da JAK2 e da FLT-3 (fator estimulador das colônias de macrófago tirosina cinase 3), receptor importante para a proliferação e diferenciação celular, relacionada à leucemia mieloide aguda (LMA). Ainda na fase 3 dos ensaios clínicos, demonstrou uma melhora no tamanho do baço e nos sintomas (JAIN; MESA; PALMER, 2017; SAEED; MCLORNAN; HARRISON, 2017; SHANTZER; BERGER; PU, 2016).

O Momelotinibe, que ainda está em desenvolvimento, também é um inibidor de JAK1 e JAK2, além de outras cinases como Kinase 2 dependente de Ciclina (CDK2, importante para a regulação do ciclo celular) e Kinase N-terminal c-Jun (JNK1, proteína importante na via de sinalização da expressão gênica, regeneração, regulação da morte celular) (JAIN; MESA; PALMER, 2017; YARZA et al., 2016). Diferentemente do Ruxolitinibe, o Momelotinibe não apresentou a anemia como efeito colateral e diminuiu a esplenomegalia e os sintomas constitucionais (SAEED; MCLORNAN; HARRISON, 2017; SHANTZER; BERGER; PU, 2016).

11.2 Drogas citorredutoras

Foi a primeira linha de tratamento usado para esplenomegalia relacionada à Mielofibrose Primária, com o principal exemplo sendo a Hidroxiureia, um medicamento

antineoplásico usado geralmente para o tratamento de leucemia mielocítica crônica resistente e melanoma. Porém, após 1 ano, o medicamento deixa de produzir uma resposta adequada e o uso de outra terapia como agentes estimuladores da eritropoiese e Danazol é exigido. O aumento da dose da Hidroxiureia pode piorar a anemia e a trombocitopenia (STAHL; ZEIDAN, 2017).

O mecanismo de ação não está totalmente esclarecido, mas a hipótese mais provável é que a Hidroxiureia provoca a inibição da síntese de DNA das células, pela enzima ribonucleotídeo redutase (HYDREA, 2017).

Seu uso na Mielofibrose Primária é justamente pelo efeito colateral que o medicamento produz. Pela inibição da síntese de DNA, a Hidroxiureia controla o ciclo celular e, assim, a proliferação de células neoplásicas. Como efeito colateral tem-se a leucopenia, podendo ser acompanhada pela trombocitopenia e anemia, e a depressão da medula óssea em alguns casos mais graves (HYDREA, 2017). Já que pacientes com algumas das mutações apresentadas podem ter um aumento na linhagem mieloide, a Hidroxiureia é recomendável para alguns casos, por exemplo, esplenomegalia sintomática e sintomas constitucionais em prognósticos de riscos baixo e intermediário 1 (O'SULLIVAN; HARRISON, 2018; TEFFERI, 2018b).

11.3 Agentes Estimuladores da Eritropoiese (AEEs)

A administração de eritropoetina recombinante humana pode aliviar os sintomas da anemia causada pelo Ruxolitinibe e pela própria Mielofibrose Primária. Porém, muitas vezes é ineficaz, principalmente em pacientes com níveis de hemoglobina muito baixos e necessitando de transfusões, e pode agravar a esplenomegalia, pela ativação da via JAK-STAT (TEFFERI, 2018b; SAEED; MCLORNAN; HARRISON, 2017).

11.4 Agentes Imunomoduladores (IMiDs)

Para a anemia e ação mielossupressora significativa, os mais utilizados são a Lenalidomida em associação com Prednisona (glicocorticoide), que diminui os níveis de toxicidade. Além disso, a Lenalidomida também apresenta propriedades antineoplásicas, antiangiogênicas, pró-eritropoiéticas e imunomoduladoras (STAHL; ZEIDAN, 2017; REVLIMID, 2016).

Seu mecanismo de ação ocorre por meio da ligação da Lenalidomida ao Cereblon, uma estrutura proteica formada pelas proteínas Cullin 4 (CUL4), reguladoras de Cullin 4 (RoC1) e proteína 1 ligante de DNA danificado (DDB-1), formando o complexo ubiquitina ligase E3. Nessa interação, o Cereblon liga-se ainda com o substrato de fatores de transcrição linfoides, resultando na via ubiquitina-proteassoma (catabolismo de proteínas no citosol e núcleo), degradação e citotoxicidade (SHI; CHEN, 2017; REVLIMID, 2016; SHI).

Contudo, a taxa de toxicidade hematológica supera a taxa de melhora da anemia. Para o cariótipo -5/5q, a Lenalidomida mostrou uma redução na carga de alelo do JAK2, esplenomegalia e aumento na apoptose do clone anormal (STAHL; ZEIDAN, 2017).

11.5 Andrógenos

O Danazol, um hormônio esteroide fraco de origem sintética, também pode ser utilizado no tratamento da anemia, esplenomegalia e, em alguns casos, para aumentar a contagem de plaquetas. Seu uso tem efeitos colaterais a serem considerados, como ganho de peso, hirsutismo, hepatotoxicidade e risco de tumores hepáticos, além de ter um tempo de resposta adequada de 6 meses. É geralmente utilizado em associação com o Ruxolitinibe e quando não há resposta com o uso de AEEs (SAEED; MCLORNAN; HARRISON, 2017; STAHL; ZEIDAN, 2017; LADOGAL, 2016).

Seu mecanismo de ação ocorre por meio da inibição da secreção de gonadotrofina, um hormônio secretado pela hipófise, que consequentemente, reduz a síntese de estrógeno no ovário e a espermatogênese. Sabe-se que o Danazol exerce ações em proteínas plasmáticas como a eritropoetina, aumentando seu nível no sangue, estimulando assim a atividade da medula óssea (LADOGAL, 2016; CERVANTES et al., 2015).

11.6 Transplante de células hematopoiéticas alogênicas

É o único tratamento que pode levar à cura da Mielofibrose Primária. Porém, vários critérios são adotados para um paciente ser considerado apto ou não a esse tipo de tratamento, devido à alta taxa de morbidade e mortalidade. A primeira linha de tratamento são os inibidores de JAK, mas o paciente pode ser submetido ao transplante se apresentar prognóstico Intermediário 2 ou risco alto, uma sobrevida de

menos de 5 anos, não responder ao tratamento com Ruxolitinibe e ter um maior risco da transformação leucêmica (O'SULLIVAN; HARRISON, 2018; LAVI; ROWE; ZUCKERMAN, 2017). Ademais, de acordo com a Sociedade Europeia de Transplante de Sangue e Medula Óssea (EBMT), é possível aplicar esse tratamento em pacientes com prognóstico Intermediário 1 e com menos de 65 anos se apresentar anemia refrataria dependente de transfusões, 2% de blastos no sangue periférico e características citogenéticas desfavoráveis (JAIN; MESA; PALMER, 2017).

A utilização do Ruxolitinibe na fase pré-transplante mostrou-se efetiva, pois primeiramente o fármaco age reduzindo a esplenomegalia e os níveis de citocinas pró-inflamatórias, melhorando a taxa de sucesso do transplante, que aumenta a sobrevida do paciente e melhora os sintomas. A combinação desses tratamentos reduziu a taxa de mortalidade relacionada ao transplante (O'SULLIVAN; HARRISON, 2018; JAIN; MESA; PALMER, 2017).

Contudo, para o sucesso efetivo, o transplante deve ser do tipo alogênico, ou seja, a medula óssea do doador deve ser 100%, ou perto disso, HLA compatível com a medula do receptor. Caso contrário, há uma grande taxa de falha do transplante e a redução da sobrevida do paciente (LAVI; ROWE; ZUCKERMAN, 2017). Com sucesso, o transplante garante a negatividade na mutação JAK2V617F (JAIN; MESA; PALMER, 2017) e pacientes com mutações no gene CALR apresentam uma sobrevida significativamente melhor (LAVI; ROWE; ZUCKERMAN, 2017).

O transplante alogênico consiste primeiramente no tratamento com quimioterapia no paciente para destruir as células hematopoiéticas da medula óssea. O paciente doador pode doar suas células-tronco hematopoiéticas por meio da medula óssea, onde se aspira o conteúdo da medula, ou por meio de punção venosa, quando o paciente é tratado primeiramente com fatores de crescimento que estimularão a produção das células-tronco hematopoiéticas e mobilizarão grandes quantidades dessas células para o sangue periférico. Por fim, as células-tronco hematopoiéticas do doador são infundidas, via intravenosa, no paciente receptor. As células se fixarão na medula óssea e começarão a se dividir e produzir novos progenitores (PORTO, 2019; JAIN; MESA; PALMER, 2017).

Assim como todo transplante, há o risco de rejeição. No caso do tratamento para Mielofibrose Primária, foram observados nos testes clínicos do Ruxolitinibe que

é possível a ocorrência de câncer de pele não-melanoma do paciente pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas. Por isso, antes do transplante, é importante a investigação de riscos de desenvolvimento câncer de pele no paciente (LAVI; ROWE; ZUCKERMAN, 2017).

A falha no transplante acontece com uma frequência de 2 a 24% dos pacientes e é dependente do tipo de doador, intensidade dos quimioterápicos, dose do transplante das células-tronco hematopoiéticas, grau de fibrose medular e tamanho do baço. Esses casos podem levar à pancitopenia e à esplenomegalia, podendo ser utilizados fatores estimuladores de colônias e a remoção do baço, respectivamente, para reverter o quadro. Caso não se resolva, é feito um reforço de células estaminais ou um segundo transplante alogênico (LAVI; ROWE; ZUCKERMAN, 2017; JAIN; MESA; PALMER, 2017).

A possibilidade da reincidência da Mielofibrose Primária desses pacientes foi relatada de 22% a 29% e pode ser tanto clínica, com a volta dos sintomas constitucionais, quanto molecular, evidenciada pelo aumento da mutação JAK2V617F, o que irá afetar diretamente a sobrevida do paciente (JAIN; MESA; PALMER, 2017).

12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise realizada, podemos concluir que a Mielofibrose Primária é uma neoplasia mutacional muito importante e perigosa, por ser diagnosticada em idade avançada, assintomática ou pelos sintomas serem inespecíficos, como anemia, fadiga, febre, leucocitose, leucopenia e trombocitose, além do fato de desenvolver uma fibrose medular progressiva e transformação leucêmica.

Por isso, é fundamental o diagnóstico precoce, rápido e específico para se definir o prognóstico com ajuda dos sistemas de pontuação MIPSS70 e GIPSS feitos pela OMS, e assim entrar com a intervenção terapêutica correta. Visando isso, a Organização Mundial da Saúde criou parâmetros para o diagnóstico, classificando o nível de fibrose medular. Porém, o diagnóstico sensível e conclusivo é dado pelos métodos moleculares, como PCR, variações de PCR e sequenciamento de Sanger, pela identificação das três principais mutações gênicas características da doença: JAK2, MPL e CALR.

A única cura para Mielofibrose Primária é o transplante de células-tronco alogênicas, mas esse apresenta diversos critérios de inclusão ao paciente e uma alta taxa de mortalidade, o que leva ao uso contínuo de fármacos inibidores de JAK, como o Ruxolitinibe, entre outros fármacos para tratar os possíveis sintomas.

A Mielofibrose Primária é uma doença hematológica rara e por isso precisa ser mais estudada, pois pode ser difícil ter acesso a informações confiáveis e precisas. Estudos estão sendo feitos ultimamente para melhorar a compreensão das causas genéticas da doença, dos sintomas, da fibrose medular, da esplenomegalia e, conseqüentemente, do tratamento, sendo que existem 2 fármacos inibidores de JAK ainda em fase de desenvolvimento, o Pacritinibe e Momelotinibe, e que apresentam melhoras nos sintomas em comparação ao Ruxolitinibe.

REFERÊNCIAS

A BADBARAN, et al. Digital-PCR assay for screening and quantitative monitoring of calreticulin (CALR) type-2 positive patients with myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, [s.l.], v. 51, n. 6, p.872-873, 15 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2016.14>.

AKADA, H. et al. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 17, p.3589-3597, 2 mar. 2010. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-04-215848>.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 127, n. 20, p.2391-2405, 11 abr. 2016. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.

AZEVEDO, Ana Paula et al. Prevalence of the Janus kinase 2 V617F mutation in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms in a Portuguese population. **Biomedical Reports**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.370-376, 5 set. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/br.2017.977>.

BEAUVERD, Yan et al. Disease characteristics and outcomes in younger adults with primary and secondary myelofibrosis. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 175, n. 1, p.37-42, 13 jun. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.14173>.

BENITES, Bd et al. Primary myelofibrosis: risk stratification by IPSS identifies patients with poor clinical outcome. **Clinics**, [s.l.], v. 68, n. 3, p.339-343, 31 mar. 2013. Fundacao Faculdade de Medicina. [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2013\(03\)oa09](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2013(03)oa09).

BIANCHI, E. et al. Genomic landscape of megakaryopoiesis and platelet function defects. **Blood**, [s.l.], v. 127, n. 10, p.1249-1259, 19 jan. 2016. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-07-607952>.

BIANCHI, Elisa et al. Role of miR-34a-5p in Hematopoietic Progenitor Cells Proliferation and Fate Decision: Novel Insights into the Pathogenesis of Primary Myelofibrosis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.145-167, 13 jan. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18010145>.

BOSE, Prithviraj; VERSTOVSEK, Srdan. Prognosis of Primary Myelofibrosis in the Genomic Era. **Clinical Lymphoma Myeloma And Leukemia**, [s.l.], v. 16, p.105-113, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2016.02.031>.

BYRNE, Michael; SAVANI, Bipin; SAVONA, Michael R.. Leveraging JAK-STAT regulation in myelofibrosis to improve outcomes with allogeneic hematopoietic stem-cell transplant. **Therapeutic Advances In Hematology**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.251-259, 16 jul. 2018. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/2040620718786437>.

CERVANTES, Francisco et al. Danazol therapy for the anemia of myelofibrosis: assessment of efficacy with current criteria of response and long-term results. **Annals**

Of Hematology, [s.l.], v. 94, n. 11, p.1791-1796, 28 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-015-2435-7>.

CILLONI, Daniela et al. Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR?. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 9, p.2249-2263, 7 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20092249>.

COOPER, Jason P.; SCOTT, Bart L.. Allogeneic transplantation for myelofibrosis with adverse risk karyotype: Attack on the clones?. **American Journal Of Hematology**, [s.l.], v. 93, n. 5, p.603-604, 30 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.25078>.

CRISTINA, Sérgio Ferreira; POLO, Blanca; LACERDA, João F.. Somatic Mutations in Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. **Seminars In Hematology**, [s.l.], v. 55, n. 4, p.215-222, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.04.005>.

FAN, Ni et al. Elevated expression of the EZH2 gene in CALR-mutated patients with primary myelofibrosis. **Annals Of Hematology**, [s.l.], v. 97, n. 7, p.1193-1208, 20 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-018-3287-8>.

FLIS, Sylwia; CHOJNACKI, Tomasz. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities. **Drug Design, Development And Therapy**, [s.l.], v. 13, p.825-843, mar. 2019. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s191303>.

FRAWLEY, Thomas et al. Development of a Targeted Next-Generation Sequencing Assay to Detect Diagnostically Relevant Mutations of JAK2, CALR, and MPL in Myeloproliferative Neoplasms. **Genetic Testing And Molecular Biomarkers**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.98-103, fev. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/qtmb.2017.0203>.

FURTADO, Larissa V. et al. Detection of MPL Mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy. **The Journal Of Molecular Diagnostics**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.810-818, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.07.006>.

GADOMSKA, Grażyna et al. Activation of TF-Dependent Blood Coagulation Pathway and VEGF-A in Patients with Essential Thrombocythemia. **Medicina**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.54-63, 16 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medicina55020054>.

GINZBURG, Yelena Z. et al. Dysregulated iron metabolism in polycythemia vera: etiology and consequences. **Leukemia**, [s.l.], v. 32, n. 10, p.2105-2116, 24 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-018-0207-9>.

GOUGH, D. J. et al. STAT3 supports experimental K-RasG12D-induced murine myeloproliferative neoplasms dependent on serine phosphorylation. **Blood**, [s.l.], v. 124, n. 14, p.2252-2261, 22 ago. 2014. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-02-484196>.

HAAS, Dionei Joaquim; TORRES, Ana Caroline Doyle. APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS DOS ANIMAIS. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Belo Horizonte, v. 14, n. 26, p.1679-1694, jan. 2016.

HOFMANS, Mattias et al. A case of chronic eosinophilic leukemia with secondary transformation to acute myeloid leukemia. **Leukemia Research Reports**, [s.l.], v. 9, p.45-47, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lrr.2018.04.001>.

HU, Min et al. Discovery and evaluation of ZT55, a novel highly-selective tyrosine kinase inhibitor of JAK2V617F against myeloproliferative neoplasms. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.49-61, 4 fev. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-019-1062-x>.

HYDREA: hidroxiureia. Responsável técnica Elizabeth M. Oliveira. São Paulo: Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA, 2017. Bula de remédio.

JAIN, Tania; MESA, Ruben A.; PALMER, Jeanne M.. Allogeneic Stem Cell Transplantation in Myelofibrosis. **Biology Of Blood And Marrow Transplantation**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.1429-1436, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.05.007>.

JAKAVI: ruxolitinibe. Responsável técnico Flávia Regina Pegorer. São Paulo: Novartis Biociencias SA, 2015. Bula de remédio.

JEONG, Ji Hun et al. Screening PCR Versus Sanger Sequencing: Detection of CALR Mutations in Patients With Thrombocytosis. **Annals Of Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.291-300, 2016. Korean Society for Laboratory Medicine (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2016.36.4.291>.

KIM, Ah Ram; SANKARAN, Vijay G. Thrombopoietin: tickling the HSC's fancy. **Embo Molecular Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.10-12, 30 nov. 2017. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201708450>.

KRIS A. WETTERSTRAND (Estados Unidos). National Human Genome Research Institute (Org.). **The Cost of Sequencing a Human Genome**. Disponível em: <<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

LADOGAL: danazol. Responsável técnica Silvia Regina Brollo. São Paulo: Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, 2016. Bula de remédio.

LAMAS, António Luís dos Santos. ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS NAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS. 2015. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, 2015.

LANGABEER, Stephen E.; HASLAM, Karl; CONNEALLY, Eibhlin. Monitoring Residual Disease in the Ph-Negative Myeloproliferative Neoplasms Post-Allogeneic Stem Cell Transplantation: More Mutations and More Methodologies. **Frontiers In Oncology**,

[s.l.], v. 4, p.1-8, 8 ago. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00212>.

LAVI, Noa; ROWE, Jacob M.; ZUCKERMAN, Tsila. Allogeneic stem-cell transplantation for myelofibrosis. **Current Opinion In Hematology**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.475-480, nov. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/moh.0000000000000381>.

LEIVA, O et al. The role of the extracellular matrix in primary myelofibrosis. **Blood Cancer Journal**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.525-525, fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2017.6>.

LESZCZYNSKA, Aleksandra et al. Detection of JAK2 Exon 12 Mutations in JAK2 V617F-Negative Polycythemia Vera Patients by Cloning Technique. **Acta Haematologica**, [s.l.], v. 136, n. 2, p.123-128, 2016. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000446798>.

LIN, Yan et al. Decitabine combined with all-trans retinoic acid as treatment in a case of primary myelofibrosis transforming into acute myeloid leukaemia. **Journal Of International Medical Research**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.1064-1071, 7 jan. 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0300060518820147>.

LINK-LENCZOWSKA, Dorota et al. A comparison of qPCR and ddPCR used for quantification of the JAK2 V617F allele burden in Ph negative MPNs. **Annals Of Hematology**, [s.l.], v. 97, n. 12, p.2299-2308, 28 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-018-3451-1>.

MA, Wanlong et al. JAK2 Exon 14 Deletion in Patients with Chronic Myeloproliferative Neoplasms. **Plos One**, [s.l.], v. 5, n. 8, p.1-7, 13 ago. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012165>.

MEIRELES, Catarina Filipa Amorim. **DOENÇAS MIELOPROLIFERATIVAS**. 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, 2014.

MESA, Ruben et al. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) have a significant impact on patients' overall health and productivity: the MPN Landmark survey. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-10, 27 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2208-2>.

MORRELL, Ruth et al. Nonfamilial,MPLS505N-Mutated Essential Thrombocythaemia. **Case Reports In Hematology**, [s.l.], v. 2013, p.1-4, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/729327>.

MOURA, Lívia Gonzaga. **EXPRESSÃO DE GALECTINAS-1 E 3 EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia Aplicada, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2012.

NAZHA, Aziz et al. Fibrogenesis in Primary Myelofibrosis: Diagnostic, Clinical, and Therapeutic Implications. **Theoncologist**. Ohio, p. 1154-1160. ago. 2015.

NUNES, Daniela Prudente Teixeira. **Efeitos da SMADs e de microRNAs na expressão gênica de TGF-B1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose e trombocitemia essencial**. 2015. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

(OMS) Organização Mundial da Saúde (Ed.). **Classificação Internacional de Doenças para Oncologia**. 3. ed. Brasil: Edusp – Editora da Universidade de São Paulo, 2005.

O'SULLIVAN, Jennifer M.; HARRISON, Claire N.. Myelofibrosis: Clinicopathologic Features, Prognosis, and Management. **Clinical Advances In Hematology & Oncology**, Londres, v. 15, n. 2, p.121-132, fev. 2018.

O'SULLIVAN, Jennifer M.; HARRISON, Claire N.. JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 451, p.71-79, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.050>.

O'SULLIVAN, Jennifer; MEAD, Adam J.. Heterogeneity in myeloproliferative neoplasms: Causes and consequences. **Advances In Biological Regulation**, [s.l.], v. 71, p.55-68, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2018.11.007>.

PALUMBO, Giuseppe A. et al. The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. **Frontiers In Oncology**, [s.l.], v. 9, p.1-22, 26 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00321>.

PAULA JUNIOR, Milton Rego de. **ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO EM PACIENTES COM MIELOFIBROSE**. 2018. 116 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

PENNA, Domenico et al. 20+ Years and alive with primary myelofibrosis: Phenotypic signature of very long-lived patients. **American Journal Of Hematology**, [s.l.], v. 94, n. 3, p.286-290, 5 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.25351>.

PIETRA, D et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.431-438, 9 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2015.277>.

PORTO. ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE LEUCEMIAS E LINFOMAS. **Transplante Hematopoiético (Medula Óssea)**. Disponível em: <<https://www.apll.org/doencas-e-tratamentos/tratamentos/transplante-hematopoietico/>>. Acesso em: 19 maio 2019.

RABADE, Nikhil et al. Molecular genetics of BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms in India. **Indian Journal Of Pathology And Microbiology**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.209-213, 2018. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/ijpm.ijpm_223_17.

REVLIMID: Lenalidomida. Reino Unido: Penn Pharmaceutical Services Limited, 2016. Bula de remédio.

RIZVI, Quratulain et al. Homozygous CALR Mutation in Primary Myelofibrosis and Its Effect on Disease Phenotype: A Case Report and Review of the Literature. **Case Reports In Hematology**, [s.l.], v. 2019, p.1-4, 20 jan. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/1430170>.

RONTAUROLI, Sebastiano et al. MiR-494-3p overexpression promotes megakaryocytopoiesis in primary myelofibrosis hematopoietic stem/progenitor cells by targeting SOCS6. **Oncotarget**, Italia, p. 21380-21397. fev. 2017.

ROSSI, Chiara et al. Role of TGF- β 1/miR-382-5p/SOD2 axis in the induction of oxidative stress in CD34+ cells from primary myelofibrosis. **Molecular Oncology**, [s.l.], v. 12, n. 12, p.2102-2123, 16 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/1878-0261.12387>.

ROSSO, Valentina et al. A novel assay to detect calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. **Oncotarget**, Turin, v. 8, n. 4, p.6399-6405, jan. 2017.

RUMI, Elisa et al. Diagnosis and management of prefibrotic myelofibrosis. **Expert Review Of Hematology**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.537-545, 22 jun. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17474086.2018.1484280>.

RUMI, Elisa; CAZZOLA, Mario. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, [s.l.], v. 129, n. 6, p.680-692, 27 dez. 2016. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-10-695957>.

SAEED, Iram; MCLORNAN, Donal; HARRISON, Claire N.. Managing side effects of JAK inhibitors for myelofibrosis in clinical practice. **Expert Review Of Hematology**, [s.l.], v. 10, n. 7, p.617-625, 19 jun. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17474086.2017.1337507>.

SANGKHAE, V. et al. The thrombopoietin receptor, MPL, is critical for development of a JAK2V617F-induced myeloproliferative neoplasm. **Blood**, [s.l.], v. 124, n. 26, p.3956-3963, 22 out. 2014. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-07-587238>.

SCHERER, Florian et al. High-throughput sequencing for noninvasive disease detection in hematologic malignancies. **Blood**, [s.l.], v. 130, n. 4, p.440-452, 9 jun. 2017. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2017-03-735639>.

SCHUBERT, Claudia et al. Differential roles of STAT1 and STAT2 in the sensitivity of JAK2V617F- vs. BCR-ABL-positive cells to interferon alpha. **Journal Of Hematology & Oncology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-16, 2 abr. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-019-0722-9>.

SHANTZER, Lindsey; BERGER, Kristin; PU, Jeffrey J.. Primary myelofibrosis and its targeted therapy. **Annals Of Hematology**, [s.l.], v. 96, n. 4, p.531-535, 19 ago. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-016-2785-9>.

SHI, Qinglin; CHEN, Lijuan. Cereblon: A Protein Crucial to the Multiple Functions of Immunomodulatory Drugs as well as Cell Metabolism and Disease Generation. **Journal Of Immunology Research**, [s.l.], v. 2017, p.1-8, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/9130608>.

SILVA, Jackline de Paula Ayres da. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS BCR-ABL NEGATIVAS. 2014. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2014.

SOYER, Nur et al. Multicenter Retrospective Analysis of Turkish Patients with Chronic Myeloproliferative Neoplasms. **Turkish Journal Of Hematology**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.27-33, 1 mar. 2017. Galenos Yayınevi. <http://dx.doi.org/10.4274/tjh.2016.0005>.

STAHL, Maximilian; ZEIDAN, Amer M.. Management of myelofibrosis: JAK inhibition and beyond. **Expert Review Of Hematology**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.459-477, 26 abr. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17474086.2017.1317590>.

STAHL, Tanja et al. Digital PCR Panel for Sensitive Hematopoietic Chimerism Quantification after Allogeneic Stem Cell Transplantation. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.1515-1527, 9 set. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17091515>.

SZUBER, Natasha; TEFFERI, Ayalew. Chronic neutrophilic leukemia: new science and new diagnostic criteria. **Blood Cancer Journal**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.1-19, fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0049-8>.

TAKENAKA, Katsuto; SHIMODA, Kazuya; AKASHI, Koichi. Recent advances in the diagnosis and management of primary myelofibrosis. **The Korean Journal Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.679-690, 1 jul. 2018. Korean Association of Internal Medicine. <http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2018.033>.

TEFFERI, Ayalew 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**, [s.l.], v. 93, n. 5, p.649-654, 24 fev. 2018a. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.25053>.

TEFFERI, Ayalew. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal Of Hematology**, [s.l.], v. 93, n. 12, p.1551-1560, 26 out. 2018b. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.25230>.

TEFFERI, Ayalew; VANNUCCHI, Alessandro M.; BARBUI, Tiziano. Polycythemia vera treatment algorithm 2018. **Blood Cancer Journal**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-7, jan. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-017-0042-7>.

TVOROGOV, Denis et al. Accumulation of JAK activation loop phosphorylation is linked to type I JAK inhibitor withdrawal syndrome in myelofibrosis. **Science Advances**, [s.l.], v. 4, n. 11, p.1-12, nov. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aat3834>.

WEISS, Cary N.; ITO, Keisuke. A Macro View of MicroRNAs: The Discovery of MicroRNAs and Their Role in Hematopoiesis and Hematologic Disease. **Mirnas In Aging And Cancer**, [s.l.], p.99-175, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.03.007>.

YARZA, Ramon et al. C-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 6, p.321-332, 12 jan. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00321>.

ZERBINI, Maria Cláudia Nogueira et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóide de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. **Bras Patol Med Lab**. São Paulo, p. 643-648. dez. 2011.

ZHAO, Shixiang et al. Impact of JAK2V617F Mutation Burden on Disease Phenotype in Chinese Patients with JAK2V617F-positive Polycythemia Vera (PV) and Essential thrombocythemia (ET). **International Journal Of Medical Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.85-91, 2016. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijms.10539>.

ZINI, Roberta et al. MiR-382-5p Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation Through the Downregulation of MXD1. **Stem Cells And Development**, [s.l.], v. 25, n. 19, p.1433-1443, out. 2016. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2016.0150>.