

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética

JUAN LUIZ COELHO SILVA

**IMPACTO CLÍNICO E LABORATORIAL DE MUTAÇÕES NO
GENE *ASXL1* EM PACIENTES COM NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS**

Recife
2016

JUAN LUIZ COELHO SILVA

**IMPACTO CLÍNICO E LABORATORIAL DE MUTAÇÕES
NO GENE *ASXL1* EM PACIENTES COM NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Genética.

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Juan Luiz Coelho

Impacto clínico e laboratorial de mutações no gene ASXL1 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas / Juan Luiz Coelho Silva. Recife: O Autor, 2016.

96 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo

Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Dissertação (mestrado) ã Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Genes 2. Tumores 3. Prognóstico I. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (orientador) II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (coorientador) III. Título

572.86

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-289

JUAN LUIZ COELHO DA SILVA

**IMPACTO CLÍNICO E LABORATORIAL DE MUTAÇÕES NO GENE
ASXL1 EM PACIENTES COM NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS**

Aprovado em 11/03/2016

**Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Biofísica e Radiobiologia**

**Dr. Moacyr de Jesus Barreto de Melo Rêgo
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Bioquímica**

**Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Genética**

Recife

2016

**Dedico este trabalho a Lindomar e Lylyan,
pelo amor e suporte diários.
Mulheres de minha vida.**

Agradecimentos

Ao Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial, nas pessoas dos professores Antonio Roberto e Marcos André, pelo esforço despendido na execução deste trabalho e para minha capacitação profissional.

À minha família, pelo apoio irrestrito e suporte durante toda caminhada, àqueles que me viram nascer e cresceram comigo, acredito ter justificado a fé em mim depositada. Especialmente à minha mãe (Lindomar), meu irmão (Igor), meu pai (Josemar), minha vó (Lucília). Sigo contando com a companhia de todos vocês.

Às pessoas que compõem hoje parte de uma nova família. À Lylyan pelo convívio e amor que cultivamos, a seus pais, Seu Pedro e Dona Nadja, Livia e Lucas, assim como aos demais integrantes Pimentel e Fragoso pelo carinho com que fui recebido em suas casas.

Ao professor Antonio Roberto, sinto-me honrado em ter sido seu primeiro aluno e em ter aproveitado a oportunidade para desempenhar-me ao máximo. Apreendi muito com você e com nosso convívio, creio ter assimilado plenamente a receita que você inspirou: acorde cedo e durma tarde, aproveite seu tempo, trabalhe muito e reclame pouco.

Aos amigos de laboratório, especialmente Diego (sete anos, macho) e Pedro. Assim como a Matheus, Igor, Guilhermy, Alexsandro, Mayara, Rayssa, Gabriela Menina, Gabriela Guedes, Luana, Diego Falcão, Betânia, Jéssica e Aleide.

Aos membros da banca de avaliação pelas valiosas contribuições a conclusão deste trabalho.

À Dr^a Fabiola Traina que permitiu a realização do estágio durante o mestrado, a mais gratificante experiência profissional que já tive.

Às amigas construídas em Ribeirão Preto, que tornaram mais agradáveis os dias durante o estágio e os brindes nos *happy hours*. Ao Lemão (gato) e sua respectiva, Renata, Ao Bernah (diliça) e sua cônjuge (Fernanda preta), ao João, a Jaque, a Ana Paula, a Fernanda, a Bruna, a Raquel (Racas), e as meninas da Citogenética, Diva, Ivana e Virginia.

Aos amigos de graduação, mesmo distantes recebi o apoio de vocês, Herbert (Betão), Celso, Clarissa Ribeiro e Clarissa Ataíde, Aíla, Camila, Nathalya e Karol.

Aos serviços de sequenciamento do NPT/FIOCRUZ e da plataforma de biotecnologia do CCB pelo suporte técnico oferecido ao trabalho.

Ao CNPq e CAPES pelo financiamento de nossas pesquisas e pela bolsa concedida, que viabilizaram o desenvolvimento deste projeto.

Ao programa de pós-graduação em Genética (PPGG) pelo suporte oferecido durante o mestrado e pela excelente capacitação oferecida.

Aos demais que, por ventura, possa ter esquecido de mencionar, mas que tiveram participação neste projeto, muito obrigado.

"We have Faith that future generation will know that here, in the middle of the twentieth century, there came a time when men of good will found a way to unite, and produce, and fight to destroy the forces of ignorance, and intolerance, and slavery, and war"

Franklin Roosevelt

Resumo

Algumas evidências destacam mutações no gene *ASXL1* como um evento importante na evolução clínica de pacientes com neoplasias hematológicas, particularmente em leucemias mieloides agudas e síndrome mielodisplásicas. Contudo, seu impacto prognóstico em neoplasias mieloproliferativas (NMP) ainda é pouco explorado. Aqui, nós caracterizamos 208 pacientes com NMP cromossomo Filadélfia (Ph) negativo (policitemia vera, PV; trombocitemia essencial, TE; mielofibrose primária, MFP), de acordo com mutações no gene *ASXL1*, e correlacionamos esses achados com características clínico-laboratoriais desses pacientes. A pesquisa das mutações foi realizada por sequenciamento *sanger*, em que polimorfismos germinativos e mutações sinonímias foram excluídas das análises. Mutações no *ASXL1* foram detectadas em 22/208 pacientes (10%), das quais quatro foram observadas em pacientes com PV (4/54; 7%), onze em pacientes com TE (11/123; 9%) e sete com MFP (7/31; 22%). As características clínicas e laboratoriais foram similares entre pacientes com *ASXL1* mutado e não mutado. Quando as entidades foram avaliadas individualmente (PV, TE e MFP), observou-se associação entre mutações no *ASXL1* e idade mais avançada em pacientes com TE ($P = 0,049$) e desenvolvimento de esplenomegalia em pacientes com MFP ($P = 0,026$). Com uma mediana de seguimento de 5,1 anos (IC95%: 4,5 a 7,3 anos), 136 pacientes (65%) desenvolveram algum tipo de manifestação clínica, sendo o desenvolvimento de complicações vasculares o mais frequente ($n=54$; 26%), seguido por esplenomegalia ($n=47$; 22%), eventos hemorrágicos ($n=30$; 14%) e trombose ($n=21$; 10%). Mutações no gene *ASXL1* não foram associadas com o desenvolvimento das referidas manifestações. Dentro deste seguimento, apenas dois pacientes evoluíram para síndrome mielodisplásica e um para leucemia mieloide aguda, todos sem mutações no gene *ASXL1*.

Palavras-chave: Neoplasias mieloides; Modificadores epigenéticos; JAK-STAT; Prognóstico.

Abstract

Accumulating evidences report mutation in *ASXL1* as an important predictor to clinical outcomes of patients with hematological malignancies, particularly acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. However, the prognostic impact in myeloproliferative neoplasm (MPN) remains underexplored. Here, we evaluated clinical and laboratory features of 208 Philadelphia negative MPN patients (polycythemia vera, PV; essential thrombocythemia, ET; primary myelofibrosis, PMF), according to mutations in *ASXL1*. Screening for *ASXL1* mutations were performed by *Sanger* sequencing. Germline variations were excluded. *ASXL1* mutations were detected in 22/208 patients (10%), of which four in PV patients (4/54-7%), 11 in ET patients (11/123-9%) and seven in PMF (7/31-22%). Baseline features were similar between *ASXL1*-mutated and non-mutated patients. Evaluated individually (PV, ET, PMF), we observed that ET patients harboring *ASXL1* mutations were older ($P = 0,049$) than *ASXL1* non-mutated patients. Similarly, PMF patients presented higher frequency of splenomegaly in *ASXL1*-mutated group ($P = 0,026$). No other features were associated with *ASXL1* mutations. The median follow-up was 5,1 years (CI95%: 4,5-7,3 years). One hundred and thirty six patients (65%) developed some of the clinical common manifestations, which the most frequent was vascular complications (n=54; 26%), followed by splenomegaly (n=47; 22%), bleeding (n=30;14%) and thrombosis (n=21;10%). *ASXL1* mutations were not associated with development of such events. In our cohort, only two patients have evolved for myelodysplastic syndrome and one for acute myeloid leukemia, all of them without mutations in *ASXL1*.

Keywords: Myeloid neoplasm; Epigenetic modifiers; JAK-STAT; Prognostic.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Figura 1: Algoritmo de investigação clínica de NMP.	25
Figura 2: Patogênese relacionada à <i>JAK2V617F</i> .	17
Figura 3: Contextualização entre principais manifestações clínicas das NMP e marcadores moleculares.	30
Figura 4: Mecanismos moleculares efetores da ASXL1.	33
Figura 5: Figura 5: Método empregado para identificação da <i>JAK2V617F</i>	43
Figura 6: Exposição esquemática das novas mutações identificadas	52
Figura 7: Tipos e localizações de mutações no ASXL1 em pacientes com NMP.	55

Lista de Tabelas

Tabela 1: Critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (2008) para diagnóstico das NMP <i>BCR/ABL1</i> negativas.	24
Tabela 2: Primers e enzima de restrição para o estudo da mutação <i>JAK2V617F</i> .	42
Tabela 3: Primers para estudo das mutações no <i>CALR</i> .	43
Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para pesquisa de mutações no gene <i>ASXL1</i> .	44
Tabela 5: Proporções de reagentes utilizados para sequenciamento do éxon 13 do <i>ASXL1</i> .	44
Tabela 6: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMPC cromossomo Ph-negativo, categorizados de acordo com as principais entidades da doença (Policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária).	49
Tabela 7: Descrição dos dados clínicos de pacientes com NMP com variações no <i>ASXL1</i> .	51
Tabela 8: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP de acordo com as mutações no gene <i>ASXL1</i> .	54

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
%	Percentual
µL	Microlitro
A	Adenina
<i>ABL1</i>	<i>Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene 1</i>
<i>Asx</i>	<i>Additional Sex Combs</i>
<i>ASXL1</i>	<i>Additional Sex Combs-Like 1</i>
<i>BCR</i>	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
<i>BCR/ABL1</i>	Gene de fusão resultante do cromossomo Filadélfia
C	Citosina
<i>CALR</i>	Gene da Calreticulina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CTX	Complexo <i>Trithorax</i>
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DNMT3A</i>	Gene da DNA Metiltransferase tipo 3
EDTA	Ácido Etileno-diamino tetracético
EPO	Eritropoietina
ER	Receptor de Estrógeno
EXO1	Exonuclease I
FLT3	Tirosino-quinase 3 relacionada ao FMS
G	Guanina
g	Grama
g/dL	Grama por decilitro
G-CSF	Fator Estimulante de Colônias Granulocíticas
GPB	Grupo <i>Polycomb</i>
H2A	Histona H2A
H3K27me3	Trimetilação do resíduo lisina 27 da histona H3
H3K4me3	Trimetilação do resíduo lisina 4 da histona H3
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
Hb	Hemoglobina

HEMOPE	Fundação de Hematologia de Pernambuco
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
JAK2	Gene da Janus Quinase 2
Kb	Quilo Base
KCl	Cloreto de Potássio
LDH	Lactato Desidrogenase
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
MFP	Mielofibrose primária
MO	Medula óssea
<i>MPL</i>	Gene do receptor de trombopoetina
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Centre for Biotechnological Information</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
NHCL	Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas
<i>NPM1</i>	Nucleofosmina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
Pb	Par de Base
Ph	Cromossomo Filadélfia
PRC1	Complexo Repressor do grupo <i>Polycomb 1</i>
PRC2	Complexo Repressor do grupo <i>Polycomb 2</i>
PV	Policitemia Vera
RAR Υ	Receptor do ácido <i>all-trans</i> retinóico Υ
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SAP	<i>Shrimp Alkalyne Phosphatase</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SP	Sangue Periférico
T	Timina

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Trombocitemia Essencial
TPO	Trombopoetina
UNILABE	Unidade de Laboratórios Especializados

Sumário

1. Introdução	16
2. Revisão da Literatura	
2.1 Neoplasias mieloproliferativas crônicas	19
2.1.1 NMP <i>BCR/ABL1</i> negativas: classificação e características clínicas	20
2.2 Diagnóstico	23
2.2.1 Marcadores moleculares de clonalidade: <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> e <i>MPL</i>	26
2.3 Marcadores prognósticos moleculares nas NMP	30
2.4 <i>Additional Sex Combs-Like 1</i>	31
2.4.1 Modelos funcionais In Vitro e In Vivo do gene <i>ASXL1</i>	34
2.4.2 <i>ASXL1</i> em neoplasias hematológicas	36
3. Objetivos	
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivo específico	38
4. Material e Métodos	
4.1 Casuística	39
4.2 Análise Molecular	40
4.2.1 Extração do DNA genômico	40
4.2.2 Pesquisa das mutações <i>JAK2V617F</i> e <i>CALR</i>	41
4.2.3 Análise de mutações no <i>ASXL1</i> por sequenciamento de Sanger	43
4.3 Bioinformática	45
4.3.1 Montagem, avaliação dos <i>Contigs</i> e classificação das mutações	45
4.3.2 Predição de consequências moleculares das variações	46
4.4 Análises estatísticas	46
5. Resultados	48
5.1 Características clínicas e laboratoriais de pacientes com NMP	48
5.2 Associação entre mutações no gene <i>ASXL1</i> e características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP	50
6. Discussão	56

7. Conclusões	62
Referências	63
8. Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73
8. Anexo B: Parecer do comitê de ética em pesquisa	75
8. Anexo C: Tabela suplementar	76
8. Anexo D: Artigo 1	77
8. Anexo E: Artigo 2	82
9. <i>Curriculum vitae</i>	87

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) são doenças clonais da célula tronco hematopoiética, caracterizadas pela proliferação anormal de precursores mieloides da medula óssea com consequente acúmulo de uma ou mais linhagens de células maduras mieloides no sangue periférico e tecidos, levando a complicações clínicas como organomegalia, trombose, hemorragia e potencial evolução para mielofibrose e leucemia aguda. Por convenção, essas neoplasias podem ser reagrupadas segundo mutações e/ou rearranjos de genes codificadores de tirosina quinases, dos quais se destacam o gene *ABL1*, frequentemente associado à translocação cromossômica t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1* ou cromossomo Filadélfia (Ph), e o gene *Janus quinase 2 (JAK2)*, envolvido na mutação somática *JAK2V617F*. No primeiro grupo (Ph-positivo), destaca-se a leucemia mieloide crônica como principal entidade, enquanto que no segundo grupo (Ph-negativo), enquadram-se a policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária, as quais estão frequentemente associadas à mutação *JAK2V617F*.

As NMP apresentam, em geral, curso clínico lento e arrastado, e são, por isso, consideradas excelentes modelos para avaliação de marcadores prognósticos durante evolução clonal dos pacientes. Isso se deve às claras distinções entre os estágios crônico e agudo das entidades. Apesar da mutação *JAK2V617F* ser reconhecida como paradigma diagnóstico para as NMP Ph-negativo, outros alvos moleculares são investigados como possível moduladores do curso clínico, isso se sustenta é duas questões básicas: 1) como uma mesma mutação pode apresentar três fenótipos distintos (PV, TE e MFP) 2) quais mutações estão associadas aos casos *JAK2* negativos (~40%). Atualmente,

acredita-se que alterações vicinais a via JAK/STAT estão relacionadas a explicação das questões elencadas anteriormente.

O *Additional sex combs-like 1* (ASXL1), homólogo humano da proteína Asx de *Drosophila*, é membro do grupo *Polycomb* de proteínas repressivas, associadas a manutenção da repressão transcricional *loci* específico. Recentemente, inúmeros estudos clínicos evidenciaram que o ASXL1 se encontra alterado em múltiplas formas de neoplasias mieloides, incluindo síndrome mielodisplásica (SMD), leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), leucemia mieloide aguda (LMA) e NMP. As alterações no ASXL1 são geralmente associadas com curso clínico adverso em LMMC, SMD e LMA, sem, contudo, haver consenso com relação às NMP, uma vez que o número de trabalhos relacionados é consideravelmente menor.

A desregulação da ASXL1 é normalmente relacionada a mutações dos tipos *frameshift* e *nonsense*, que têm como resultado uma proteína truncada em sua região C-terminal, *upstream* ao seu domínio funcional, a porção PHD. Os dados clínicos publicados até o momento sugerem um importante papel do ASXL1 na patogênese e/ou transformação das neoplasias mieloides. Contudo, ainda é necessária a elucidação da função da ASXL1 na hematopoiese normal e leucêmica, afim de determinar sua real participação nos referidos processos.

Usualmente, as mutações apresentam-se heterozigotas, sugerindo uma haploinsuficiência do ASXL1 na regulação funcional da célula tronco hematopoiética. Estas mutações são também identificadas na síndrome de Bohring-Optiz, condição rara caracterizada por anormalidades faciais, múltiplas malformações, inabilidades intelectuais e morte precoce, estes dados, coletivamente, sugerem que mutações somáticas no ASXL1 conduzem a

neoplasias mieloides, assim como mutações germinativas causam fenótipos de alterações do desenvolvimento, corroborando, assim, com a hipótese que a *ASXL1* está envolvida na regulação da expressão gênica em diversos processos e tecidos.

Diante do exposto, o presente projeto tem como principal objetivo caracterizar pacientes com NMP Ph-negativo de acordo com mutações no gene *ASXL1* e correlacionar esses achados com características clinico-laboratoriais desses pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neoplasias mieloproliferativas

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) são desordens hematológicas clonais caracterizadas por uma proliferação aumentada dos componentes celulares mieloides (Vardiman & Hyjek 2011). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece as seguintes entidades de NMP: Leucemia Mieloide Crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE), Mielofibrose Primária (MFP), Mastocitose Sistêmica, Leucemia Neutrofílica Crônica, Leucemia Eosinofílica Crônica e NMP inclassificável (OMS 2008). Entretanto, a LMC, PV, TE e MFP são as entidades com maior destaque por suas prevalências. Apesar de serem classificadas em diferentes entidades, as NMP compartilham algumas características fisiopatológicas comuns. Isso se deve, ao fato de que esta proliferação anormal dos componentes mieloides surge a partir de vias de sinalização celular constitutivamente ativadas que afetam mecanismos de controle de proliferação celular e apoptose (Passamonti 2012).

Por convenção, essas neoplasias podem ser reagrupadas segundo mutações e/ou rearranjos de genes codificadores de tirosina quinases, dos quais se destacam o gene *ABL1*, frequentemente associado à translocação cromossômica $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$ ou cromossomo Filadélfia (Ph), e o gene *JAK2*, envolvendo principalmente uma mutação somática no domínio regulatório da proteína Janus quinase 2, que consiste na substituição de uma valina por fenilalanina no códon 617 (*JAK2V617F*), além de mutações adicionais no éxon 12. No primeiro grupo (Ph-positivo), destaca-se a LMC como principal entidade, enquanto que no segundo grupo (Ph-negativo), enquadram-se a PV, TE

e MFP, as quais estão frequentemente associadas à mutação *JAK2V617F* (Tefferi & Vardiman 2008).

O desenvolvimento de drogas seletivas inibidoras de tirosina quinase (ITQ), representou, sem dúvida, um grande avanço no tratamento de pacientes com LMC, com consequente melhoria no curso clínico desses pacientes, e transformando esta doença em uma das neoplasias com melhores taxas de remissão e sobrevida global (Mughal et al. 2014). Por outro lado, as NMP Ph-negativo não possuem a mesma eficiência terapêutica e, dada à heterogeneidade clínica entre estes pacientes, a predição do desenvolvimento das principais complicações relacionadas às entidades, tais como trombose (PV e TE), hemorragia (TE) e fibrose medular (MFP), é consideravelmente mais complicada (Barosi et al. 2014).

2.1.1 NMP *BCR/ABL1* negativas: classificação e características clínicas

As NMP negativas para o rearranjo *t(9;22)/BCR-ABL1*, incluindo as entidades PV, TE e MFP, são doenças hematológicas originadas de alterações clonais da célula-tronco hematopoiética e são caracterizadas por proliferação de precursores mieloides na medula óssea, com consequente produção excessiva de uma ou mais linhagens de células maduras mieloides do sangue periférico (Kvasnicka 2013). Coletivamente, a incidência anual das NMP supracitadas é de 0,5 a 2,5 casos por 100.000 habitantes (Barosi et al. 2014). Clinicamente, essas doenças caracterizam-se por graus variados de eritrocitose, trombocitose, leucocitose, organomegalia secundária à hematopoese extramedular, trombose e hemorragia, que, em último grau, pode resultar em mielofibrose grave e transformação para leucemia aguda (Tefferi & Vardiman 2008; Vardiman & Hyjek 2011).

A PV possui incidência anual de 0,7-2,6 casos por 100.000 habitantes, tendo como principal característica a expansão clonal de eritrócitos no sangue periférico (Angona et al. 2015; Tefferi 2015). É importante destacar que esta expansão é independente de eritropoietina (hormônio regulador da eritropoiese fisiológica), e que o aumento do número de hemácias (eritrocitose) é comumente acompanhado do aumento simultâneo de plaquetas (plaquetose) e leucócitos (leucocitose), clinicamente sumarizado como panmielose. Atualmente, aceita-se que a desregulação molecular da via JAK-STAT, majoritariamente causada por mutações em *JAK2*, é a responsável pela etiopatogenia da PV (Geyer et al. 2014; Tefferi 2015). Pacientes com esta entidade podem apresentar-se completamente assintomáticos, sendo diagnosticados após algum evento tromboembólico ou algum achado sugestivo em exame laboratorial realizado com outra finalidade. Aproximadamente 30 a 40% dos pacientes apresentam sintomas constitucionais, em que se destacam a cefaleia, prurido, fraqueza, sudorese noturna e tontura (Nemer et al. 2014).

Os principais eventos identificados ao diagnóstico são os trombóticos ou hemorrágicos, devidos, principalmente, a eritrocitose, plaquetose e maior adesão destas células ao endotélio vascular. Estas manifestações podem resultar em sérias complicações como o acidente vascular cerebral (AVC) ou disfunções cardiovasculares, sobretudo em pacientes idosos (Barbui et al. 2013; Finazzi et al. 2013; Enblom et al. 2015). A urgência do diagnóstico decorre do fato que, sem tratamento, estes pacientes podem ter consequências mais drásticas provenientes das complicações cardiovasculares, além de potencial evolução patológica para mielofibrose ou leucemia aguda (LA) (Tefferi 2015).

A TE possui incidência anual de 0,2 a 2,27 casos a cada 100.000 habitantes e envolve, principalmente, o comprometimento da linhagem megacariocítica, sendo caracterizada por um aumento sustentado e persistente da contagem de plaquetas ($>450 \times 10^9/L$) no sangue periférico, exacerbação da megacariopoiese e por episódios clínicos de trombose e/ou hemorragia. Por não possuir um marcador genético ou biológico específico para TE, para realização de seu diagnóstico, outras causas de plaquetose devem ser previamente excluídas, incluindo outras NMP (OMS, 2008; Tefferi 2015). As principais manifestações estão associadas às complicações cardiovasculares, em que se destacam os eventos trombóticos e hemorrágicos (Kiladjian 2012; Finazzi et al. 2013). Contudo, aproximadamente metade dos pacientes com TE são assintomáticos ao diagnóstico (Lekovic et al. 2015).

A MFP tem incidência de 0,1 a 1,0 caso para cada 100.000 habitantes/ano, e é caracterizada por um quadro leucoeritroblástico, presença de precursores eritróides e leucocitários no sangue periférico, leucocitose e/ou citopenias, fibrose medular progressiva e hematopoiese extramedular com esplenomegalia (OMS 2008). Pode ocorrer *de novo* (MFP) ou como resultado de progressão da PV ou TE (MF pós-PV/TE) sem diferenças clínicas ou histológicas entre elas (Mascarenhas et al. 2013). Entre as NMP *BCR/ABL1* negativas, a MFP é a entidade que apresenta maior risco de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA), ocorrendo em até 20% dos pacientes em 10 anos de seguimento (Gangat et al. 2011; Engle et al. 2014). Assim como as demais NMP, apresenta complicações clínicas decorrentes de problemas cardiovasculares (Finazzi et al. 2013; Tefferi 2014).

2.2 Diagnóstico

Em 2008 a OMS normatizou os critérios diagnósticos para as NMP *BCR/ABL1* negativas. Atualmente, este diagnóstico é baseado em uma estratégia inter profissional que leva em consideração a clínica do paciente, com a avaliação do desenvolvimento de complicações cardiovasculares ou esplenomegalia, por exemplo, alterações laboratoriais específicas, observadas pelo hemograma, mielograma ou biópsia óssea, e ainda a detecção de alterações genéticas recorrentes (Passamonti 2012).

Recentemente estes critérios foram revisados pelo comitê gestor de neoplasias hematológicas da OMS, em que destacam-se as inclusões, em caráter mandatório, da avaliação histopatológica através da biópsia óssea que evidencie panmielose nos pacientes em investigação de policitemia vera, assim como, a inclusão dos novos marcadores moleculares diagnósticos: mutações no éxon 9 no gene da Calreticulina (*CALR*) e mutações no éxon 10 do receptor da trombopoietina (*MPL*), para os pacientes em investigação diagnóstica de TE e MFP negativos para mutação *JAK2V617F* (Tefferi & Pardanani, 2016). Na tabela 1 estão sumarizados os critérios diagnósticos utilizados atualmente.

Tabela 1: Critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (2008) para diagnóstico das NMPBCR/*ABL1* negativas.

Entidades	Policitemia vera	Trombocitemia essencial	Mielofibrose primária
Critérios maiores	1: Hemoglobina >16,5 g/dL (Homens); > 16,0 g/dL (Mulher).	1: Plaquetas >450X10 ⁹ /L	1: Presença de elementos atípicos na megacariopoesse
	2. Identificação de marcador clonal (<i>JAK2</i> V617F ou mutações adicionais no éxon 12)	2. Biópsia de MO apresentando hiperplasia da linhagem megacariocítica com atipismos	2. Identificação de marcador clonal (<i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou, <i>CALR</i>)
	Biópsia de MO evidenciando panmielose	3. Critérios para exclusão de outras causas de trombocitose reativa ou NMPCs	3. Critérios para exclusão de outras NMPCs
	-	4. Identificação de marcador clonal (<i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou, <i>CALR</i>)	-
Critérios menores	Eritropoietina sérica diminuída	-	Quadro leucoeritroblástico
	Avaliação de formação de colônia eritróide <i>In Vitro</i>	-	Elevação dos níveis de LDH
	-	-	Anemia
	-	-	Esplenomegalia
	Requer os dois critérios maiores e ao menos um menor	Requer os quatro critérios	Requer os três critérios maiores e ao menos dois menores

ABREVIACÕES: MO: Medula Óssea; LDH: Lactato Desidrogenase.

A identificação de marcadores clonais coletivos às NMP Ph-negativo é considerada o principal destaque da revisão dos critérios supracitados, e a mutação *JAK2*V617F permitiu a atribuição de um critério diagnóstico objetivo (Tefferi et al. 2011; Zhang et al. 2014). Devido às particularidades de cada entidade, diferentes algoritmos são utilizados para classificação NMP associadas a mutação *JAK2*V617F. Na figura 1 explicitamos o algoritmo sugerido pela OMS, e utilizado neste trabalho, para investigação clínica de NMP.

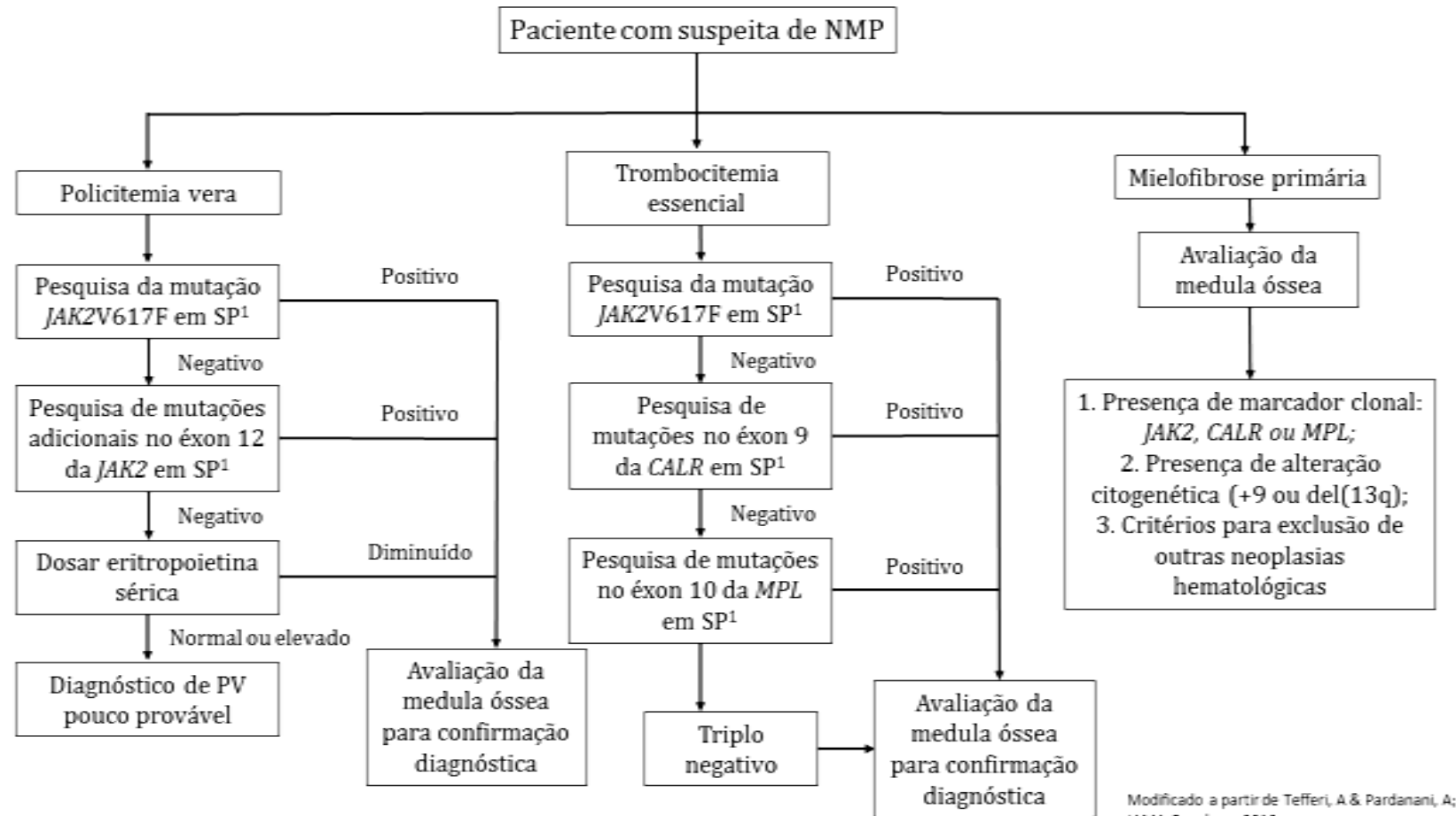


Figura 1: Algoritmo de investigação clínica de NMP. Preconizado pela OMS e revisado recentemente por seu comitê gestor, evidencia os principais achados clínicos e organização hierárquica para investigação diagnóstica das NMP *Ph*-negativas. Modificado a partir de Tefferi & Pardanani, 2016.

2.2.1 Marcadores moleculares de clonalidade: *JAK2*, *CALR* e *MPL*

A mutação somática de maior frequência nas NMP Ph-negativo é a p.Val617Phe (*JAK2*V617F) (Baxter et al. 2005; Kralovics et al. 2005; Zhao et al. 2005; Lundberg et al. 2014; Zhang et al. 2014). Esta mutação ocorre no éxon 14 do gene *JAK2* (localização 9p24), em que há a substituição de uma guanina por uma timina, resultando na troca de uma valina por fenilalanina na posição 617. A presença da *JAK2*V617F está associada a ativação constitutiva da proteína *JAK2*, um receptor do tipo tirosina quinase responsável pela transdução de sinais de controle da proliferação e diferenciação celulares (Chen and Mullally 2011; Toms et al. 2013). A identificação da *JAK2*V617F, é hoje parte integrante de uma abordagem diagnóstica para as NMP.

A função efetora da *JAK2* é desempenhada por sua região JH1, a qual possui atividade catalítica de tirosina quinase. Esta atividade catalítica é regulada negativamente pelo domínio JH2 da *JAK2*, que exerce função pseudoquinase sobre a JH1, ou seja, a região JH2 atua impedindo a ativação indiscriminada do domínio catalítico da *JAK2* (Toms et al. 2013; Pasquier et al. 2014). São conhecidas três regiões inibitórias no domínio pseudoquinase: IR1(619-670), IR2 (725-757) e IR3 (758-807). A mutação *JAK2*V617F impede, portanto, a função inibitória da IR1, o que permite que a região JH1 exerça sua função sem a regulação da JH2 (Bandaranayake et al. 2012). Mutações adicionais no éxon 12 também estão envolvidas na patogênese das NMP, especialmente PV (Scott et al. 2007). Similarmente, mutações no éxon 12 envolvem a região JH2, corroborando, desse modo, a hipótese de que a perda do controle negativo promovido por esta região seja chave para a desregulação da via JAK-STAT, responsável pelo

desenvolvimento das NMP (Grünebach et al. 2006; Schnittger et al. 2006; Lee et al. 2009; Ma et al. 2009).

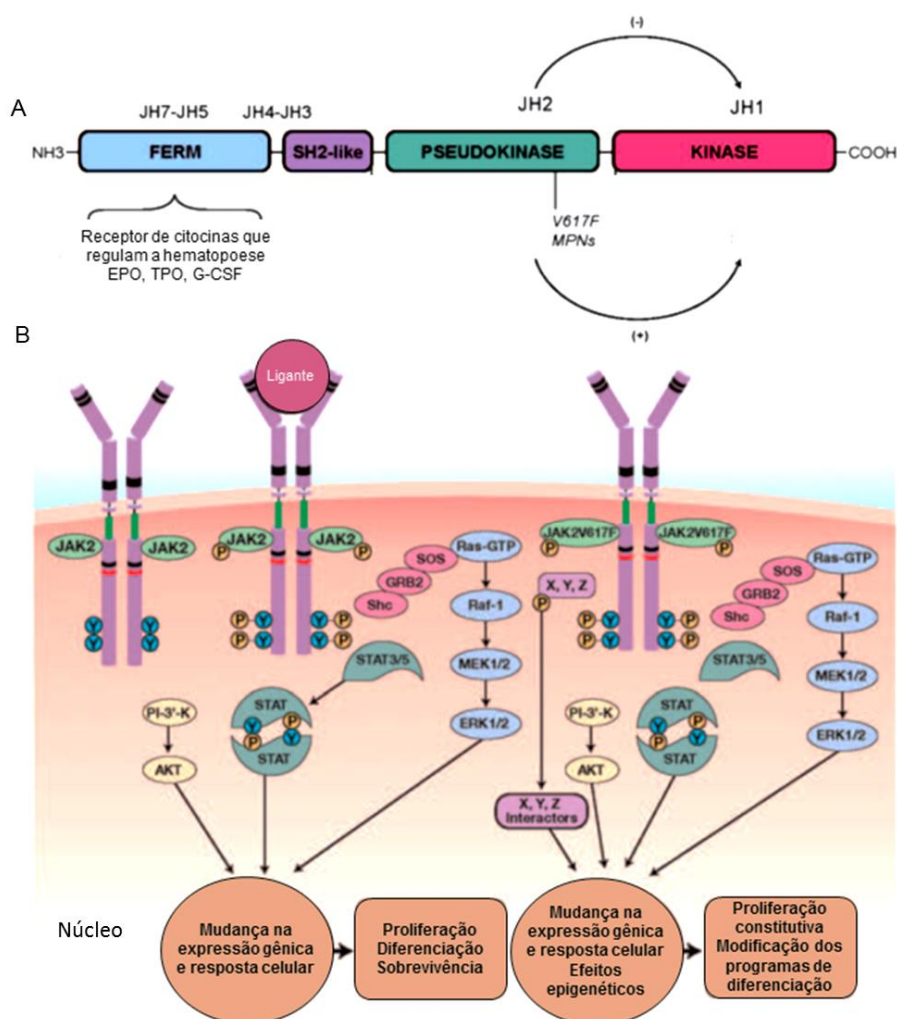


Figura 2: Patogênese relacionada à JAK2V617F. **A)** Estrutura sequencial da proteína JAK2, em que se nota a proximidade entre os domínios JH1 e JH2. Fisiologicamente, o domínio pseudoquinase (JH2) exerce controle negativo sob o domínio catalítico JH1. A mutação V617F causa um dano que impede a região JH2 exercer sua função. O domínio dFERM é a região responsável pela ligação dos fatores que regulam a hematopoiese, aqui listados como Eritropoietina (EPO), Trombopoietina (TPO) e Fator Estimulante de Colônias Granulocíticas (G-CSF). A sinalização constitutiva da JAK2, mediada pela mutação V617F, torna, portanto, a célula independente destes fatores de crescimento. As mutações no éxon 12 também comprometem a função do domínio JH2, de maneira similar a V617F. **B)** Cascata de sinalização regulada pela ativação da JAK2. Sumariamente, a ativação da sinalização pelo ligante, deflagra sinais de proliferação via proteínas STATs. A vantagem proliferativa conferida pela JAK2V617F é considerada paradigma para compreensão da patogênese das NMP Ph-negativo, uma vez que justifica a proliferação celular descontrolada e a inibição de sinais pró apoptóticos. Modificado de Vainchenker & Constantinescu, 2012.

O *CALR* é um gene localizado no cromossomo 19, contém 9 éxons, e extensão de 4,6kb. Este codifica uma proteína, a calreticulina, uma chaperona

multifuncional ligante de cálcio, de localização luminal no retículo endoplasmático (RE) (Gardai et al. 2005). Sua proteína possui três domínios com diferentes propriedades funcionais e estruturais: I- o domínio N-terminal, capaz de ligar lectinas e possui uma sequência de endereçamento da proteína ao RE; II- é uma região de conexão rica em prolina (domínio-P); III- trata-se da região C-terminal, que por seu caráter ácido, tem afinidade aumentada ao Ca^{++} . Ademais, no terceiro domínio da proteína, há uma sequência conservada chamada KDEL, responsável pela localização da Calreticulina no RE (Chi et al. 2014; Guglielmelli et al. 2014b).

Recentemente, mutações somáticas do tipo *Frameshift* (inserções ou deleções-*indels*) foram descritas no gene *CALR* em pacientes com NMP Ph-negativo (Klampfl et al. 2013; Nangalia et al. 2013; Chi et al. 2014). Aproximadamente 50 diferentes *indels* foram relatados, restritos ao éxon 9, sendo os mais frequentes, uma deleção de 52pb, chamado de tipo 1, e uma inserção de 5pb (TTGTC) denominado tipo 2 (Tefferi et al. 2014). Os *indels* em *CALR* estão presentes aproximadamente 67-82% dos pacientes com TE e 80-88% dos pacientes com MF, negativos para a mutação V617F em *JAK2* (Klampfl et al. 2013; Nangalia et al. 2013; Chi et al. 2014).

Quanto às características clínicas e laboratoriais dos pacientes com mutações em *CALR*, é descrita a associação positiva entre menores níveis de hemoglobina e leucócitos; níveis elevados de plaquetas; risco diminuído para trombose e maior sobrevida em pacientes com TE. Na MF, as referidas mutações estão associadas à leucopenia, trombocitose e melhores índices de sobrevida (Klampfl et al. 2013). Por mediar os sinais de degradação celular quando exposta na superfície celular, acredita-se que a perda funcional da *CALR* conduza a um

quadro de inibição da apoptose, favorecendo, assim, a proliferação e sobrevivência celulares (Gardai et al. 2005).

O receptor de trombopoetina é codificado pelo gene *MPL*, localizado no cromossomo 1, locus p24. As mutações mais frequentes em *MPL* estão no éxon 10, mais precisamente nos códons 505 (p.Ser505Asn) e 515 (p.Trip515Leu/Lys). Usualmente, as mutações em *MPL* estão presentes em pacientes *JAK2V617F* negativos, sem, contudo, serem eventos mutuamente exclusivos. A prevalência de mutações neste gene é de 8% em pacientes com MFP e de 3% nos pacientes com TE (Pardanani et al. 2006; Steensma et al. 2006; Tefferi & Pardanani, 2016).

Sumariamente, apenas uma pequena parcela de pacientes com suspeita clínica de NMP (16,5% dos pacientes com TE e 10% dos pacientes com MF) não pode ser caracterizada, do ponto de vista molecular, para conclusão diagnóstica (Klampfl et al. 2013). Entretanto, apesar dos avanços diagnósticos, a estratificação destes pacientes quanto ao risco de evolução clonal e/ou desenvolvimento de complicações clínicas ainda é obscuro, fazendo com que a busca de marcadores prognósticos seja de grande interesse acadêmico e clínico (Passamonti et al. 2016).

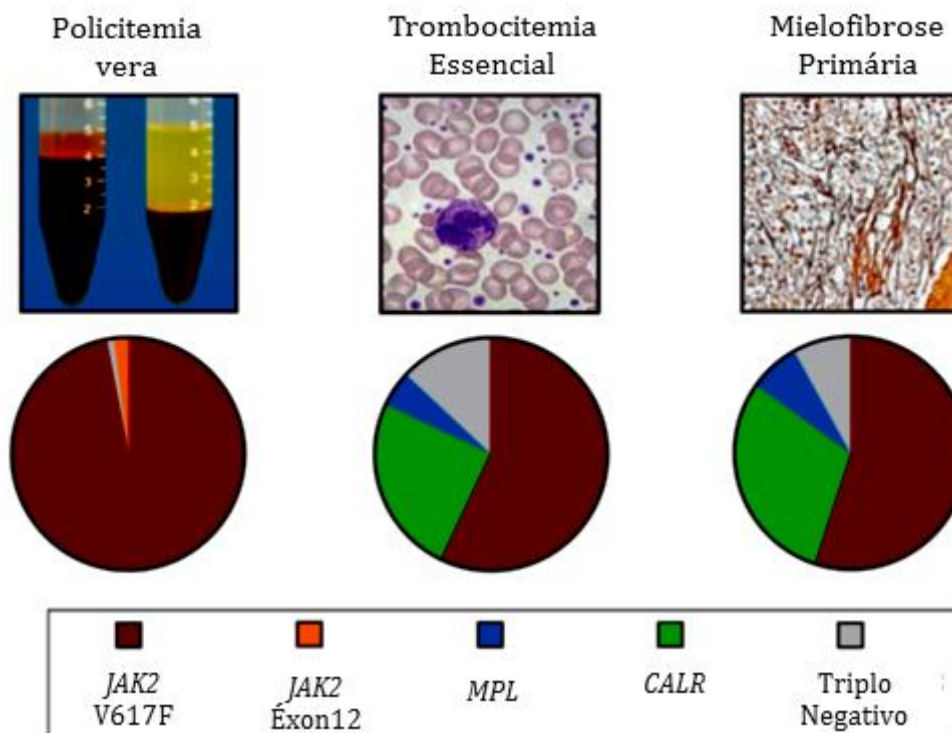


Figura 3: Contextualização entre principais manifestações clínicas das NMP e marcadores moleculares. As NMPCs Ph-negativo apresentam similaridade quanto aos marcadores moleculares. Nesta imagem comparativa, observamos as características clínicas inerentes a cada entidade. Na PV, destacamos a eritrocitose como principal sinal clínico, e, em linhas gerais, podemos afirmar que sua patogênese é devida a mutações no *JAK2*. A TE e MFP apresentam outros marcadores associados ao diagnóstico, em que se destacam o *CALR* e *MPL*. Como principais sintomas em TE e MFP, são aqui destacadas, a trombocitose e a deposição de fibras reticulínicas na MO, respectivamente. Modificado de Nangalia & Green 2014.

2.3. Marcadores prognósticos moleculares nas NMPCs

Apesar da clara associação entre mutações envolvidas na via JAK-STAT e a patogênese das NMP Ph-negativo, tem ganhado força o entendimento que, alterações não associadas a referida via desempenham papel importante no estabelecimento das NMP. Esta observação se baseia nas seguintes questões: 1) uma parcela dos pacientes com TE e MFP não possuem um marcador de clonalidade, como descritos na sessão anterior; 2) desenvolvimento de três entidades patológicas distintas determinadas a partir de mutações semelhantes (Kim & Abdel-Wahab 2013).

A esse respeito, a identificação de marcadores genéticos, que possam prever o desenvolvimento de determinadas entidades, ou ainda, que permita inferir o risco potencial de evolução clonal ou desenvolvimento das complicações clínicas decorrentes das NMP, são os modos pelos quais tem se centrado esforços para resolução das questões elencadas acima (Vardiman and Hyjek 2011; Gelsi-Boyer et al. 2012; Poletto et al. 2012; Shih et al. 2012; Grisouard et al. 2015). Acredita-se que a leucemogênese seja, portanto, um processo multifatorial dependente de diferentes alterações moleculares concomitantes (Murati et al. 2012).

Atualmente, as alterações moleculares associadas às neoplasias hematológicas, não apenas as NMP Ph-negativo, são categorizadas em cinco classes:

- Fatores de sinalização celular: fatores relacionados às vias JAK-STAT, *MPL*, *FLT3*, família *RAS*
- Fatores de transcrição mieloide: *CEBP α* , *NPM1*, *RUNX1*
- Reguladores epigenéticos: *ASXL1*, *DNMT3A*, *TET2*
- Supressores tumorais: *TP53*, *WT1*
- Processamento de RNA: *SF3B1*, *SRSF2*

Os exemplos citados denotam, sumariamente, a complexidade de fatores interligados que dão origem ao processo neoplásico.

2.4 Additional Sex Combs-Like 1

Em 2003 Fischer e colaboradores descreveram o primeiro de três homólogos humanos do gene *Asx* de *Drosophila* (Fisher et al. 2003). Denominado *ASXL1*, este gene é localizado no cromossomo 20, locus q11 e é constituído por

13 éxons que codificam um mRNA com 6,8 kb, e sua proteína com 166.000 daltons (Katoh 2013).

A funcionalidade do *ASXL1* pode ser inferida a partir do conhecimento de seu homólogo de *Drosophila*. Inicialmente, o gene *Asx* foi relacionado ao controle transcricional de genes homeóticos, função esta mediada pelos complexos repressores do grupo *Polycomb* 1 e 2 (PRC1 e PRC2) (Sinclair et al. 1998a; Sinclair et al. 1998b)

Do ponto de vista molecular, a função da proteína *Asx* é executada por meio de duas modificações estruturais da cromatina, a primeira resultante da trimetilação do resíduo lisina 27 da histona H3 (H3K27Me3), resultado da ação do PRC2, e a segunda que se refere a monoubiquitinação do resíduo lisina 119 da histona H2A, mediada pelo PRC1 (Katoh 2013). Ambas sinalizações epigenéticas são reconhecidas como relacionadas à repressão transcricional *loci* específico, sendo importante destacar, a manutenção funcional, neste aspecto, pelo homólogo humano (Shih et al. 2012).

Estruturalmente, a proteína *ASXL1* possui cinco domínios conservados interespecies. O primeiro, chamado *ASXN* é localizado na região N-terminal, e modula a ligação da proteína ao DNA. O domínio *ASXH* é relacionado a interação proteína-proteína entre *ASXL1* e alguns efetores. Os domínios *ASXM1* e *ASXM2* também estão associados a interação proteína-proteína, ligando-se a receptores de hormônios nucleares e seus efetores. Por fim, o domínio *PHD* possui um motivo de ligação a histonas e DNA. O referido *Motif*, consiste de quatro cisteínas seguidas por uma histidina e mais três cisteínas (C4HC3), e modula a ligação de modificadores de cromatina e fatores de transcrição, sendo por isso considerado

o domínio funcional da ASXL1 (Fisher et al. 2003; Fisher et al. 2010; Lee et al. 2010; Abdel-Wahab & Dey, 2013).

Mutações do tipo *Nonsense* ou *frameshift* têm como resultado uma proteína truncada na extremidade carboxil, abolindo, por fim, a função desempenhada pela porção PHD (Fisher et al. 2003; Katoh 2013).

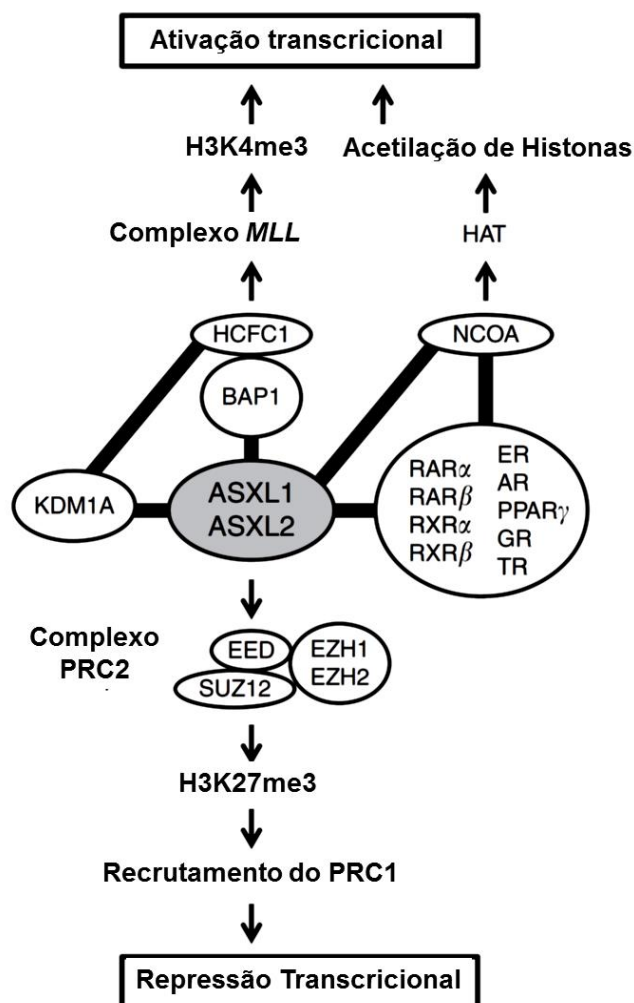


Figura 4: Mecanismos moleculares efetores da ASXL1. A proteína ASXL1 executa suas funções de maneira central, controlando a ativação e repressão da transcrição. Inicialmente, por sua interação com a BAP1, em sua porção ASXH, ela modula a retirada da ubiquitina do resíduo lisina 119 da histona H2A, este sinal relaciona-se a perda da repressão transcricional. Paralelamente, interage fisicamente com receptores de hormônios nucleares, como exemplo o RAR α , RAR β e ER, por sua porção ASXM1 e ASXM2, conduzindo assim a uma ativação da transcrição por meio da acetilação de histonas. Antagonicamente, a repressão é mediada pelos complexos repressores do grupo *Polycomb* 1 e 2 (PRC1 e PRC2), em que o segundo complexo executa a trimetilação do resíduo lisina 27 da histona H3, e esta sinalização epigenética recruta o PRC1 para realizar a ubiquitinação do resíduo lisina 119 da histona H2A. FONTE: Modificado de KATOH, 2013.

De maneira geral, mutações no *ASXL1* foram associadas a poucas desordens em humanos, em que se destacam as mutações *de novo*, comumente relacionadas ao desenvolvimento da Síndrome de Bohring-Optiz e neoplasias de tecidos sólidos, nas quais, as frequências de mutações são recorrentemente baixas, em torno de 1-5%, e presentes em tecidos diversos, como cervical, prostático, mamário, intestinal (Inoue et al. 2013; Katoh 2013).

2.4.1 Modelos funcionais *In Vitro* e *In Vivo* do gene *ASXL1*

Recentemente, Valetta e colaboradores utilizaram a tecnologia do CRISPR/Cas9 para correção da mutação *Nonsense ASXL1* p.G710X presente na linhagem celular de leucemia mieloide crônica KBM5. Após a correção observou-se o restabelecimento da expressão da proteína ASXL1, assim como de sua interação com o PRC2 e BAP1. Ademais, as células editadas para mutação no *ASXL1* apresentaram maior capacidade de se diferenciar terminalmente, e, em modelo de transplante de medula óssea xenográfico, os camundongos que receberam as células editadas para a mutação apresentaram melhores taxas de sobrevivência global quando comparados aos que receberam células sem edição (Valletta et al. 2015).

Assim como este estudo, outros creditam a patogênese relacionada ao *ASXL1* a perda de função proveniente das mutações, além disso, a apresentação exclusivamente como heterozigotas das mutações é outro fato que reitera a hipótese de haploinsuficiência. (Fisher et al. 2010; Abdel-Wahab et al. 2013). Paralelamente, acredita-se que as mutações provoquem uma função anômala da proteína mutada, exercendo sobre a selvagem um controle dominante negativo (Abdel-wahab et al. 2012; Inoue et al. 2013; Wang et al. 2014).

Em contrapartida, outras abordagens sugerem que as mutações no *ASXL1* causariam um ganho de função através de sua interação com a BAP1 (Balasubramani et al. 2015). Esta hipótese se baseia no complexo efector responsável pela sinalização epigenética de deubiquitinação do resíduo lisina 119 da histona H2A (H2AK119Ub), o ócomplexo deubiquitinase repressivo do grupo Polycombô (PR-DUB), composto pela *ASXL1* e BAP1 (Scheuermann et al. 2010). A inserção de mutações em *ASXL1* associadas às neoplasias mieloides foi capaz de diminuir em 90% a marcação H2AK119Ub, através de um aumento na atividade do PR-DUB (Balasubramani et al. 2015).

Apesar de não haver consenso no que se refere ao mecanismo fisiopatológico, a função do *ASXL1* em neoplasias hematológicas foi extensamente estudada. Modelos animais *Knock-out* para o *ASXL1* apresentam profundas alterações em seu desenvolvimento, em que se destacam a alta letalidade ao nascimento, anoftalmia, microcefalia, presença de fendas palatinas e malformações ósseas (Abdel-Wahab et al. 2013; Inoue et al. 2013; Wang et al. 2014). Estes achados condizem com parte dos achados clínicos encontrados em pacientes portadores da Síndrome de Bohring-Optiz, condição genética rara causada pela presença de mutações germinativas *de novo* nos genes *ASXL1* e *ASXL3* (Hoischen et al. 2011; Russell et al. 2015).

No que se refere ao tecido hematopoiético, os modelos apresentam alterações semelhantes à Síndrome Mielodisplásicas, com presença de sinais displásicos em todas as linhagens celulares (eritróide, granulocítico e megacariocítico), citopenias (diminuição nas contagens dos elementos figurados no sangue periférico) e achados de hematopoiese extramedular com

esplenomegalia (Fisher et al. 2010; Abdel-Wahab et al. 2013; Inoue et al. 2013; Rampal et al. 2014; Wang et al. 2014).

2.4.2 ASXL1 em neoplasias hematológicas

A maioria das mutações no *ASXL1* são encontradas em neoplasias mieloides, afetando, principalmente, o último éxon (13) (Gelsi-Boyer et al. 2012). As principais mutações associadas são do tipo *frameshift* ou *nonsense*, que, como resultado, produzem uma proteína truncada em sua porção C-terminal (Abdel-Wahab & Levine 2013). Contudo, mutações do tipo *missenses*, que levam a substituição de aminoácidos, também podem afetar a função da proteína por comprometerem seu arranjo estrutural (Pratcorona et al. 2012; Paschka et al. 2015).

Mutações no *ASXL1* foram identificadas em todas as neoplasias mieloides, incluindo síndromes mielodisplásicas (SMD), leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), LMA e NMP (Murati et al. 2012). A frequência de mutações entre estas entidades varia entre poucos casos (LMA~6,5%), sendo mais frequente em pacientes com SMD (40-45%) e com LMMC(50%) (Chung et al. 2012; Pratcorona et al. 2012; Bejar et al. 2014; Bravo et al. 2014; Paschka et al. 2015). Estudos que envolvam a avaliação de mutações no *ASXL1* em NMP são escassos, principalmente em países em desenvolvimento.

Desde sua descoberta, realizada em 2009 por Gelsi-Boyer e colaboradores, as mutações no *ASXL1* têm sido utilizadas como indicador prognóstico em todo espectro de neoplasias mieloides. Em estudo prévio, utilizando uma coorte composta por 449 pacientes com SMD, mutações em cinco

genes demonstraram impacto prognóstico adverso: *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* e *ASXL1* (Bejar et al. 2011). Coletivo aos pacientes com SMD e NMP as mutações no *ASXL1* predizem maior risco de evolução clonal para LMA, e nestes pacientes estão associados a piores índices de sobrevida global e sobrevida livre de doenças.

Com relação as NMP Ph-negativo, o *status* do *ASXL1* confere maior agressividade a doença e pior sobrevida global em pacientes com MFP. A frequência de mutações em PV e TE é consistentemente menor, 10% e 7%, respectivamente (Sorigué et al. 2016). Entretanto, não há, até o momento, estabelecimento de como as referidas mutações modulem o curso clínico das NMP, nem tampouco, uma contextualização entre o perfil de mutação e dados clínico-laboratoriais destes pacientes. Diante do exposto, o presente o projeto, teve como objetivo, caracterizar pacientes com NMP Ph-negativo de acordo com mutações no *ASXL1*, contextualizando estes achados com as características clínico-laboratoriais destes pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar pacientes com NMP Ph-negativo (PV, TE e MFP) de acordo com mutações no gene *ASXL1*, e correlacionar estes achados com o desfecho clínico e com características clínicas e laboratoriais desses pacientes.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar clínica e laboratorialmente os pacientes com NMP Ph-negativo;
- ✓ Determinar a frequência de mutações na região codificante do éxon 13 do gene *ASXL1* em pacientes com NMP Ph-negativo ;
- ✓ Correlacionar as mutações no gene *ASXL1* com características clínicas e laboratoriais e desfecho clínico de pacientes com NMP Ph-negativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

O estudo foi do tipo coorte com comparação de grupos internos, tendo sido realizado pelo Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas (NHCL LabCEN/CCB/UFPE) e nas Unidades de Hematologia Clínica e Laboratórios Especializados da Fundação HEMOPE (UNILABE). Foram incluídos no estudo 264 pacientes, de ambos os sexos com diagnóstico de NMP Ph-negativo. Os referidos pacientes foram acompanhados no ambulatório do Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, Recife-PE.

Os critérios de exclusão empregados foram a presença do rearranjo *BCR/ABL1* ou cromossomo Filadélfia, pacientes cujos diagnósticos fossem inconclusivos ou não respektassem plenamente os critérios expostos anteriormente, ou ainda a indisponibilidade de acesso aos dados dos prontuários clínicos para caracterização clínica e laboratorial dos pacientes. As variáveis analisadas ao diagnóstico foram: idade, sexo, subtipo de NMP com base nos critérios supracitados da OMS, dados do hemograma (contagem de leucócitos e plaquetas e níveis de hemoglobina e hematócrito) e os demais achados clínicos relatados durante a evolução do paciente, tais como histórico de trombose, diagnóstico de síndromes metabólicas e necessidade transfusional, por exemplo. O material utilizado na pesquisa foi o mesmo encaminhado aos laboratórios de rotina para fins diagnósticos, e não foi feita nenhuma coleta adicional nos pacientes. Foi dada preferência a utilização do material proveniente do aspirado de medula óssea (MO), entretanto, quando este não estava disponível, foi utilizado sangue periférico (SP) anticoagulado em EDTA.

Dois conjuntos de dados foram categorizados nos seguintes grupos: presença de fatores de risco cardiovascular e sintomas constitucionais, a partir deste momento tratadas coletivamente. Neste âmbito, os fatores de risco cardiovascular reúnem pacientes com Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), *Diabetes Mellitus* (DM), Doença Renal Crônica (DRC) e/ou histórico de tabagismo, enquanto que os sintomas constitucionais englobam a presença de um ou mais dos seguintes sintomas: pletora, prurido, dor óssea, suor noturno, febre, fadiga, perda de peso, saciedade precoce e desconforto abdominal.

O presente trabalho é parte de um projeto maior, que objetiva a caracterização molecular de pacientes com NMP, e teve sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOPE (Nº do parecer: 013/09) (Anexo 2). Todos pacientes, após entrevista, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1), previamente aprovado pelo CEP.

4.2 Análise Molecular

4.2.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizado seguindo a técnica de extração com base no fenol-clorofórmio modificado (Davis et al 1986). Resumidamente, as amostras de SP ou MO foram submetidas a lise dos eritrócitos com auxílio de uma solução hipotônica (NH_4Cl 0,144M e NH_4HCO_3 0,01M), seguido de centrifugação a 1.200rpm por 10 min. Após o descarte do sobrenadante, uma solução de lavagem (TKM1, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 10 μ l de Triton X-100. Após homogeneização e centrifugação a 1.200rpm por 10 minutos, o

sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, um precipitado de leucócitos. A este precipitado foi adicionado 400 µL da solução de lise de leucócitos (TKM2, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25 µL de SDS 10% e incubado à 55°C durante 45 minutos. Após esse período, 180 µL de NaCl 5M foram adicionados e a solução mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, esse material foi centrifugado a 14.000rpm por 5 minutos e o sobrenadante recuperado e transferido para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionando 400 µL de fenol tamponado e 400 µL da solução SEVAG, composta de 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico, seguido de homogeneização e centrifugação a 14.000rpm por 5 minutos.

Mais uma vez o SEVAG foi misturado ao sobrenadante para última separação, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Neste novo microtubo, foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,2 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada estéril, quantificado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EUA).

4.2.2 Pesquisa da mutação *JAK2 V617F* e *CALR*

A detecção da mutação *JAK2V617F* no éxon 14 foi realizada como descrito por Baxter et al (2005), esta metodologia possui sensibilidade de 2-10%. Na tabela 1 estão listados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e a enzima para o estudo da mutação, assim como o tamanho dos fragmentos após amplificação e análise por restrição com a endonuclease.

Tabela 2: *Primers e enzima de restrição para o estudo da mutação JAK2 V617F.*

Sequência dos primers (5'→ 3')	Produto de PCR	Enzima de restrição	Produto da digestão
<i>Forward:</i> GGGTTTCCTCAGAACGAACGTTGA	460 pb	BsaXI	241 pb
<i>Reverse:</i> TCATTGCTTTCCTTTTTCACAA			189 pb
			30 pb

Após verificação da amplificação de fragmentos de tamanho esperado, os produtos foram submetidos à reação de digestão pela enzima de restrição *BsaXI* (*New England BioLabs®*, EUA). A reação foi realizada com: 5µl de produto de PCR, 1x de *CutSmart® Buffer*, e 1U de *BsaXI*, em volume final de 15µl. A reação ocorreu a 37°C *overnight*. O fragmento amplificado a partir do alelo selvagem *JAK2* é digerido em fragmentos de 241 pares de base (pb), 189pb e 30pb (Figura 4A) pela enzima, no entanto, a mutação *JAK2V617F* acarreta na perda de 2 sítios reconhecidos pela enzima evitando seu corte, mantendo o fragmento intacto (460pb). A análise de digestão foi realizada em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio (Figura 4).

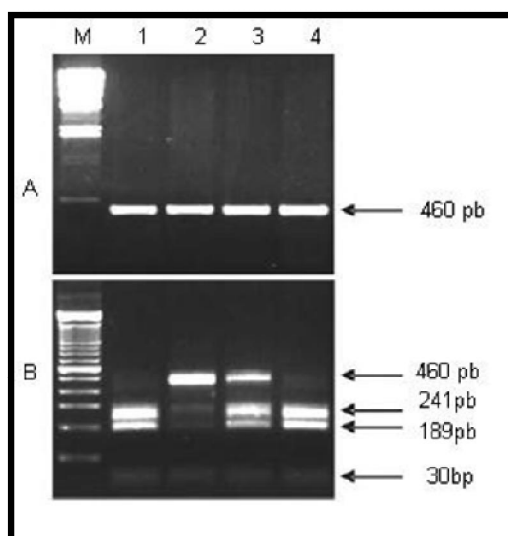


Figura 5: Método empregado para identificação da JAK2V617F A. Produto de PCR da JAK2 V617F contendo 460pb. B. Padrões de digestão da JAK2 com a enzima *BsaX I* apresentando positividade no sítio não digerido permanecendo com 460pb após a digestão (alelo mutado): M: Marcador de peso molecular de 100pb; 1: Paciente com TE com alelos normais para a mutação JAK2V617F 2: Paciente com PV, homozigoto para mutação JAK2V617F 3: Paciente com MFP; mostrando um alelo normal e um alelo mutado (heterozigoto) para mutação JAK2V617F; 4: Amostra de indivíduo saudável. Modificado de Monte-Mór et al. 2007).

A pesquisa de mutações no *CALR* foi realizado utilizando sequenciamento capilar segundo metodologia publicada previamente (Klampfl et al. 2013). Abaixo estão listados os *primers* utilizados para pesquisa das mutações. O protocolo para sequenciamento é descrito adiante.

Tabela 3: *Primers* para estudo das mutações no *CALR*.

Sequência do <i>primers</i> (5'→ 3')	Produto de PCR
<i>Foward</i> : ACAACTTCCTCATCACCAACG	263pb
<i>Reverse</i> :GGCCTCAGTCCAGCCCTG	

4.2.3 Análise de mutações no *ASXL1* por sequenciamento de Sanger

A pesquisa das mutações do gene *ASXL1* foram realizadas por sequenciamento direto dos produtos de PCR. Os *primers* utilizados na pesquisa foram descritos previamente por Gelsi-Boyer et al. (2009). Devido a extensão do éxon 13 do *ASXL1*, em que a região codificante possui 2907pb, foi necessário

amplificá-lo em segmentos que permitissem a utilização do sequenciamento capilar. Desse modo, avaliamos a referida região em 6 *amplicons* com aproximadamente 550pb. Abaixo estão listados os oligonucleotídeos utilizados com os tamanhos esperados de amplificação.

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para pesquisa de mutações no gene *ASXL1*.

<i>Primer</i>	<i>Forward (5'→3')</i>	<i>Reverse (5'→3')</i>	<i>Produto</i>
ASXL1_P1	AGGTCAGATCACCCAGTCAGTT	TAGCCCATCTGTGAGTCCAAGTGT	561
ASXL1_P2	AGAGGACCTGCCTTCTCTGAGAAA	TTCGATGGGATGGGTATCCAATGC	558
ASXL1_P3	ACTTGAAAACCAAGGCTCTCGT	GCAACCATCCCATCTGTCCTTGTA	532
ASXL1_P4	GGTGGACAAGGATGAGAAACCCAA	TGTCCTGTGACATAGCACGGACTT	674
ASXL1_P5	TGGATTCCAAAGAGCAGTTCTCTTC	CATGACAAAGGCATCCCTTCCAA	533
ASXL1_P6	ACAGGAAAGCTACTGGGCATAGTC	CAAGAGTGCTCCTGCCTAAAGAGT	593

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando o MasterMix GoTaq® (Promega®, EUA) e avaliadas em gel de agarose a 1%. Para confirmação de mutações não descritas previamente foi utilizado a *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen®, ThermoFischer Company, EUA). Antes de submeter os produtos de PCR à reação de sequenciamento, estes foram purificados utilizando o *mix* de enzimas Exo-Sap IT® (USB Laboratories, EUA) composto por Exonuclease I e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). A química utilizada para sequenciamento foi a do kit *BigDye Cycle Sequencing®* (Applied Biosystems, EUA), utilizando a proporção de reagentes listada na tabela 4.

Tabela 5. Proporções de reagentes utilizados para os sequenciamentos.

Reagente	Volume (µL)
Produto de PCR purificado	5,0
Tampão de sequenciamento (5x)	2,0
<i>BigDye Premix®</i>	0,5
<i>Primer</i> (5pmol)	1,0
Água ultrapura	1,5

A precipitação da placa utilizou o protocolo EDTA-acetato de sódio-etanol, em que, sumariamente, os produtos provenientes da reação de sequenciamento são precipitados utilizando 2µL de acetato de sódio 3M pH5,2, 2µL de EDTA 125mM e 50µL de etanol 100% gelado e centrifugados a 2250g por 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado com *spin* da placa invertida a

180g por 1 minuto. Os produtos foram lavados com etanol 70% gelado e centrifugados novamente a 2250g por 15 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, os produtos foram ressuspensos em *Hi-Di® Formamide* (Applied BioSystems, EUA) no momento da injeção.

O sistema automático utilizado foi o *3500 XL Genetic Analyzer®* (Applied BioSystems, EUA) disponível pelo Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (NPT-CPqAM/FIOCRUZ) e pela plataforma biotecnológica do Centro de Ciência Biológicas. Ao menos duas sequências de cada conjunto de *primers* para cada paciente foram produzidas, obtendo deste modo as sequências referentes às fitas molde e complementar.

4.3 Bioinformática

4.3.1 Montagem, avaliação dos *contigs* e classificação das mutações

Após confirmação da qualidade das sequências, estas foram comparadas com a sequência de referência (NG_027868.1) referendada pelo *NCBI* (do inglês, *National Centre for Biotechnological Information*). As sequências (*contigs*) foram montadas e avaliadas utilizando o *Software CLC MainWorkBench® 6.9.1*. O mesmo programa foi utilizado para identificar as consequências das variações identificadas.

Após identificação das alterações, estas foram classificadas nos seguintes tipos: silenciosas (sem alteração na sequência de aminoácidos), *missense* (com substituição de aminoácidos), *nonsense* (com inserção de códons de parada prematuros) e *frameshift* (em que há alteração na matriz de leitura proveniente de inserções e/ou deleções).

Os pacientes que apresentaram mutações *nonsense* e *frameshift* foram categorizados como mutados, assim como os que apresentavam mutações

missenses com prevalência menor que 1% segundo bancos de dados públicos (*Exome Variant Sequence*-NIH e dbSNP). Os que apresentaram mutações que levam a substituição de aminoácidos com prevalência superior a 1% e variações silenciosas foram categorizados como selvagens.

4.3.2 Predição de consequências moleculares das variações

As mutações do tipo *missense* primeiramente relatadas em nosso estudo foram avaliadas utilizando a ferramenta online *PolyPhen-2*® (V.2.2.2R398). Com esta análise é possível inferir o possível dano molecular provocado pela mutação. Esta ferramenta estabelece em uma escala de 0 a 1 a possibilidade de dano, em que o zero se refere a mínima probabilidade de dano e o um relaciona-se ao risco provável de dano.

É importante destacar, que a ferramenta *Poly-Phen-2* sugere o impacto molecular de mutações levando em consideração as características químicas dos aminoácidos envolvidos na substituição, e se os locais em que há a troca são estruturalmente importantes para a função efetora da proteína, não havendo com isso, comprovação conclusiva sobre o efeito das mutações.

4.4 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada de forma descritiva com o auxílio do software SPSS Statistics 19.0. Os pacientes com NMP foram categorizados de acordo com a presença ou ausência de mutações no gene *ASXL1*. Pacientes que apresentaram mutações no éxon 13 deste gene foram classificados com *mutados*, enquanto que, na ausência dessas mutações, os pacientes foram incluídos no grupo *não mutado*. As variáveis contínuas foram comparadas utilizando os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, enquanto que para

variáveis categóricas foi utilizado o teste do *Chi*-quadrado ou teste exato de Fisher. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Características clínicas e laboratoriais de pacientes com NMP

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP estão resumidas na Tabela 1. Foram incluídos no estudo 264 pacientes com NMP, dos quais 69 (26%) pacientes foram diagnosticados com PV, 151 (57%) com TE e 41 (17%) com MFP. A mediana da idade ao diagnóstico foi de 59 anos (intervalo: 4 a 95 anos), com predomínio do sexo feminino (66%). Alterações laboratoriais específicas e sintomas relacionados a cada entidade estão resumidos na Tabela 1.

A presença de mutações no gene *JAK2* foi observada em 155 pacientes (59%;155/261). Para os pacientes com PV, 60 apresentaram a mutação *JAK2V617F* (87%; 60/69) e dois apresentaram mutações no éxon 12 (22%; 2/9). Para os pacientes com TE e MFP a frequência da mutação *JAK2V617F* foi de 44% e 58%, respectivamente. Nenhum paciente com TE ou MFP apresentou mutações no éxon 12 da *JAK2*.

Em seguida, realizamos a pesquisa de mutações em *CALR* e *MPL* em 60 pacientes com TE *JAK2V617F* negativos. No total, 23 pacientes com TE possuíram mutações em *CALR* (38%; 23/60) e três apresentaram mutações em *MPL*, perfazendo um total de 22% (33/151) de pacientes triplo negativos. Para os pacientes com MFP realizamos o sequenciamento da *CALR* em 14 pacientes, dos quais sete apresentaram-se mutados (50%; 7/14). Nenhum paciente com MFP apresentou mutações no *MPL*, totalizando 18% de pacientes triplos negativos. Três pacientes com MFP não foram triados para pesquisa de mutações dos marcadores moleculares de clonalidade devido a indisponibilidade de material genético (DNA) para as análises.

Tabela 6: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP cromossomo Ph-negativo, categorizados de acordo com as principais entidades da doença (policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária).

Características	Todos pacientes (n = 264)		Policitemia vera (n = 69)		Trombocitemia essencial (n = 153)		Mielofibrose primária (n = 42)		P-valor
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
Sexo									0,021
Mulher	173	65,5	39	56,5	111	72,5	23	54,7	
Homem	91	34,5	30	43,5	42	27,5	19	45,3	
Necessidade transfusional									< 0,001*
Não	232	87,9	65	94,2	141	92,1	24	57,1	
Sim	32	12,1	4	5,8	12	7,9	18	42,9	
Esplenomegalia									< 0,001
Não	191	72,3	41	59,4	135	88,2	13	30,9	
Sim	73	27,7	28	40,6	18	11,8	29	69,1	
Trombose									0,632
Não	241	91,3	61	88,4	122	79,7	38	90,4	
Sim	23	8,7	8	11,6	31	20,3	4	9,6	
Hemorragia									0,302
Não	231	87,5	55	79,7	137	89,5	37	88,1	
Sim	33	12,5	14	20,3	16	9,5	5	11,9	
Complicações vasculares									0,002*
Não	202	76,5	42	60,9	125	81,6	33	78,5	
Sim	62	23,5	27	39,1	28	18,4	9	21,5	
JAK2									< 0,001*
Não mutado	107	41,0	7	10	85	55,5	14	33,4	
Mutado	155	59,0	62	90	68	44,5	25	66,6	
CALR									0,371
Não Mutado	46	60,5	-	-	37	61,6	7	50	
Mutado	30	39,5	-	-	23	39,4	7	50	
Risco cardiovascular									0,022*
Não	106	40,2	18	26,1	69	45,1	17	40,4	
Sim	158	59,8	51	73,9	84	54,9	25	59,6	
Sintomas constitucionais									< 0,001*
Não	152	57,6	24	34,8	105	68,6	23	54,8	
Sim	112	42,4	45	65,2	48	3	19	46,2	
Idade (anos), mediana	58,8		66		54,3		58,5		0,006*
Intervalo	4,7 ã 95,1		21,6 - 86,1		4,7 ã 86,6		25,4 - 95,1		
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	11,2		12,1		10,0		20,9		< 0,001*
Intervalo	2,1 ã 83,6		4,2 - 24,6		2,1 - 48,1		2,6 - 54,3		
Hematócrito (%), mediana	43,1		61,5		40,5		35,9		< 0,001*
Intervalo	16,9 ã 79		44,1 - 79		17,8 ã 48,4		16,9 ã 49		
Hemoglobina (g/dL), mediana	13,9		19,8		13,2		11,4		< 0,001*
Intervalo	5,2 ã 26,7		16 ã 26,7		5,2 ã 16,1		5,3 - 15,8		
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	736		526		906		516		< 0,001*
Intervalo	26 ã 3262		132 - 1440		465 - 1880		26 - 2125		
LDH (U/L), mediana	495		584,5		395,5		716		< 0,001*
Intervalo	163 ã 3690		222 - 1262		163 - 1358		252 - 3690		

NOTA: * valores estatisticamente significantes.

5.2 Associação entre mutações no gene *ASXL1* e características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP

Dos 264 pacientes incluídos neste estudo, foi possível determinar o *status* mutacional do gene *ASXL1* em 208 (79%) pacientes. Os 56 pacientes restantes não possuíam amostras disponíveis no momento do diagnóstico ou apresentaram material de má qualidade e, conseqüentemente, foram excluídos das análises. É importante ressaltar que as características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos nas análises, ou seja, aqueles que foram caracterizados quanto ao *status* mutacional do gene *ASXL1*, foram semelhantes àsquelas dos pacientes não incluídos (Tabela suplementar 1).

Durante a pesquisa das mutações no gene *ASXL1*, foram identificadas mutações silenciosas, com substituição de aminoácidos (*missense*), inserção de códons de parada prematuro (*nonsense*) e mutações com mudança da matriz de leitura (*frameshift*). Como descrito previamente no Material e Métodos (**seção 4.3**), os pacientes que apresentaram variações silenciosas ou do tipo *missense* com frequência superior a 1% foram classificados como não mutados.

Duas mutações *missenses* não descritas na literatura foram identificadas em nosso trabalho (p.C632Y p.P698R), ambas em pacientes com TE. A Tabela 6 resume as principais alterações encontradas. No total, 36 (17%; 36/208) pacientes apresentaram variações na estrutura primária da *ASXL1*, contabilizando as variações *missenses* com frequência superior a 1%, dos quais 22 (10%;22/208) apresentaram mutações do tipo *nonsense*, *frameshift* ou *missense* com prevalência inferior a 1%.

Tabela 7: Descrição dos dados clínicos de pacientes com NMP com variações no ASXL1. NOTA:NA: não se aplica.

Amostra	Sexo/Idade (anos)	Classificação OMS	Mutação		Prevalência	Marcador clonal	Grupos
01PV	fem/44	PV	c.A2513G	p.K838R	1,5%	JAK2V617F	Não mutado
01TE	fem/56	TE	c.G3306T	p.E1102D	0,1%	JAK2V617F	Mutado
04PV	fem/60	PV	c.1934delG	p.G645fs*58	NA	negativo	Mutado
04TE	mas/46	TE	c.G2251A	p.V751I	2,3%	negativo	Não mutado
06TE	fem/53	TE	c.G1954A	p.G652S	1,7%	JAK2V617F	Não mutado
09PV	fem/62	TE	c.G1954A	p.G652S	1,7%	JAK2V617F	Não mutado
10MF	mas/72	MFP	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	NA	JAK2V617F	Mutado
11PV	mas/53	PV	c.G2113T	p.E705*	NA	JAK2V617F	Mutado
11TE	fem/40	TE	c.C3973T	p.L1325F	4%	Negativo	Não mutado
195Ů	fem/58	TE	c. A1898G	p.H633R	0,03%	JAK2V617F	Mutado
27TE	mas/77	TE	c.G1954A	p.G652S	1,7%	JAK2V617F	Não mutado
36TE	fem/76	PV	c.C1907T	p.A636V	0,07%	JAK2V617F	Mutado
38TE	fem/57	TE	c.G1954A	p.G652S	1,7%	negativo	Não mutado
39TE	fem/23	TE	c.G1945T	p.G649*	NA	JAK2V617F	Mutado
40TE	mas/46	MFP	c.G1954A	p.G652S	1,7%	CALR	Não mutado
421Ů	fem/81	TE	c.G1954A	p.G652S	1,7%	JAK2V617F	Não mutado
42TE	mas/59	TE	c.G3947A	p.R1316H	0,015%	negativo	Mutado
43PV	fem/59	PV	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	NA	JAK2V617F	Mutado
43TE	mas/4	TE	c.G2251A	p.V751I	2,3%	CALR	Não mutado
48TE	fem/75	TE	c.C2094G	p.P698R	NA	JAK2V617F	Mutado
60TE	fem/67	TE	c.C1815A	p.C605*	NA	JAK2V617F	Mutado
64TE	mas/60	TE	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	NA	JAK2V617F	Mutado
69TE	mas/47	TE	c.C3498G	p.S1166R	0,8%	negativo	Mutado
72TE	mas/66	TE	c.G1895A	p.C632Y	NA	CALR	Mutado
874Ů	mas/62	MFP	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	NA	CALR	Mutado
328Ů	mas/52	MFP	c.C2077T	p.R693*	NA	CALR	Mutado
20Ů	fem/50	MFP	c. A1898G	p.H633R	0,03%	CALR	Mutado
767Ů	fem/43	TE	c.G1954A	p.G652S	1,7%	CALR	Não mutado
176Ů	fem/54	MFP	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	NA	CALR	Mutado
429Ů	mas/64	TE	c.G1954A	p.G652S	1,7%	negativo	Não mutado
521Ů	fem/83	TE	c.C1815A	p.C605*	NA	JAK2V617F	Mutado
437Ů	fem/55	MFP	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	NA	JAK2V617F	Mutado
760Ů	mas/76	TE	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	NA	JAK2V617F	Mutado
769Ů	fem/15,8	TE	c.G1954A	p.G652S	1,7%	negativo	Não mutado
12TE	fem/57	TE	c.C3973T	p.L1325F	4%	negativo	Não mutado
169Ů	fem/95	MFP	c. A1898G	p.H633R	0,03%	JAK2V617F	Mutado

Os pacientes foram categorizados como não mutado por suas variações apresentarem frequências maiores a 1%. As mutações *nonsense* e *frameshift* listadas, assim como as duas novas *missenses* descritas neste trabalho não

puderam ser acessadas pois não estão presentes nos bancos de dados pesquisados, e incorporam, com as *missenses* com frequência inferior a 1%, o grupo *mutado*

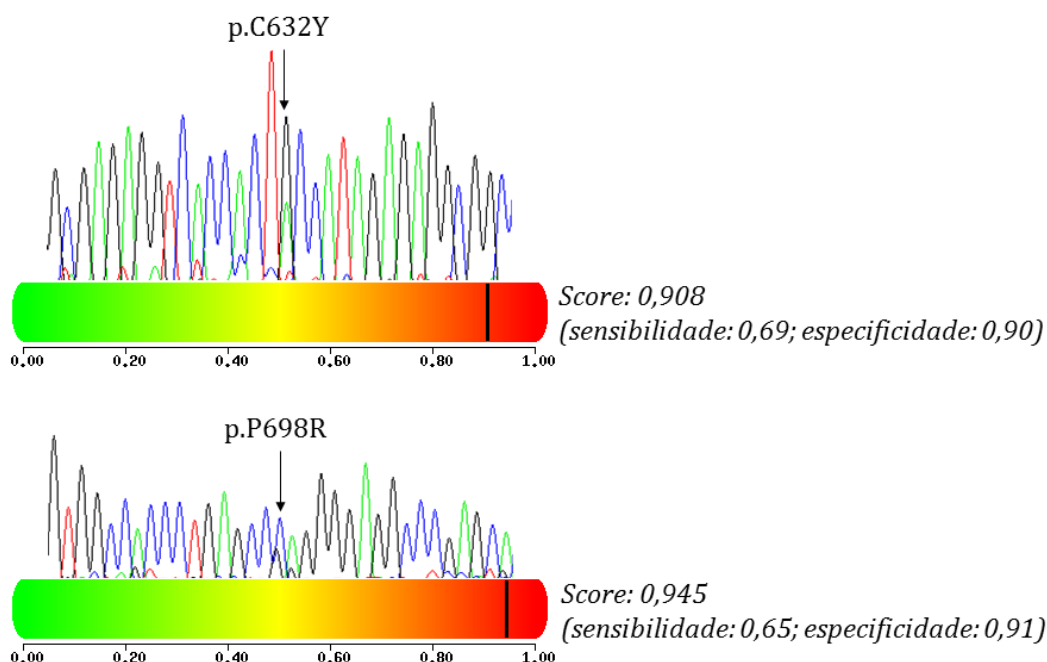


Figura 6: Exposição esquemática das novas mutações identificadas. São destacadas as substituições nos eletroferogramas, na parte superior vemos a mutação c.G1895A e na inferior c.C2094G. Os gráficos provenientes da análise no *Poly-Phen-2* estão localizados abaixo dos respectivos eletroferogramas evidenciando a probabilidade de dano molecular predita.

Coletivamente, 22 (13%) pacientes apresentaram mutações no gene *ASXL1*, dos quais 4 (7,5%) foram diagnosticados com PV (4/54), 11 (9%) pacientes com TE (11/123) e 7 (22%) com MFP (7/31). As mutações mais frequentes foram do tipo *missense*, seguidas pelas do tipo *frameshift*, em que a p.G646Wfs*12 (c.1934dupG) foi a mais prevalente, encontrada em 7 pacientes (32%; 7/22).

A Tabela 7 resume as principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP. Notamos que os pacientes com mutações no *ASXL1* são mais velhos que os selvagens, embora esta diferença não seja significativa ($P = 0,066$). Não houve diferenças entre os grupos de pacientes com *ASXL1* mutado e

não mutado com relação ao gênero ($P = 0,139$), contagem de leucócitos ($P = 0,907$) e plaquetas ($P = 0,143$) no sangue, dosagem de hemoglobina ($P = 0,419$), hematócrito ($P = 0,431$) e LDH ($P = 0,311$). Os pacientes mutados para o *ASXL1* apresentaram mais esplenomegalia, percentualmente, quando comparados aos selvagens ($P = 0,062$). Com relação as demais consequências clínicas relativas às entidades não houve diferenças entre os grupos. Ademais, a frequência de mutações no *JAK2* e *CALR* entre os pacientes com *ASXL1* mutado e não mutado foram similares entre os grupos ($P = 0,859$ e $P = 0,225$, respectivamente).

Quando avaliadas individualmente (PV, TE e MFP), o padrão de mutação no gene *ASXL1* não apresentou associação com nenhuma das características clínicas e laboratoriais abordadas, com exceção da idade mais avançada em pacientes com TE mutados para o *ASXL1* ($P=0,049$; mediana: 63,8 *versus* 52,8), e da associação entre mutações no *ASXL1* e o desenvolvimento de esplenomegalia em pacientes com MFP ($P= 0,026$).

A mediana de seguimento para as principais manifestações clínicas da doença (evolução clonal, esplenomegalia, trombose, hemorragia e complicações vasculares) foi de 5,1 anos (IC-95%: 4,5 a 7,3 anos). Dentro deste seguimento, dois pacientes evoluíram para SMD e apenas um paciente evoluiu para LMA, o que impossibilitou análises a respeito da evolução clonal da doença. Os pacientes que evoluíram para SMD e LMA apresentaram características clínicas e laboratoriais similares àqueles que não evoluíram (dados não mostrados). Cento e trinta e seis pacientes (65%; 136/208) desenvolveram algum tipo de manifestação clínica, sendo as mais frequentes: complicações vasculares (54/208; 26%), esplenomegalia (47/208; 22%), seguida por eventos hemorrágicos

(30/208; 14%) e trombose (21/208; 10%). Mutações no gene *ASXL1* não foram associadas com o desenvolvimento das referidas manifestações (Tabela 7).

Tabela 8: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP de acordo com as mutações no gene *ASXL1*.

Características	Todos pacientes (n =208)					Policitemia vera (n = 54)					Trombocitemia essencial (n = 123)					Mielofibrose primária (n = 31)				
	ASXL1				P- valor	ASXL1				P- valor	ASXL1				P- valor	ASXL1				P- valor
	Mutado (n = 22)		Não mutado (n = 186)			Mutado (n = 4)		Não mutado (n = 50)			Mutado (n = 11)		Não mutado (n = 112)			Mutado (n = 7)		Não mutado (n = 24)		
	No.	%	No.	%		No.	%	No.	%		No.	%	No.	%		No.	%	No.	%	
Sexo					0,139					0,979					0,137					0,384
Mulher	12	54,5	130	69,5		3	75	30	60		6	54,5	84	74,3		3	42,8	16	66,7	
Homem	10	45,5	57	30,5		1	25	20	40		5	45,5	29	25,7		4	57,8	8	33,3	
Necessidade transfusional					0,184					0,989					0,903					0,685
Não	17	77,3	163	87,2		4	100	47	94		10	90,9	103	91,1		3	42,8	13	54,2	
Sim	5	22,7	24	12,8		-	-	3	6		1	9,1	10	8,9		4	57,8	11	47,8	
Esplenomegalia					0,062					0,953					0,978					0,026
Não	13	59,1	144	77,0		3	75	30	60		10	90,9	102	90,2		0	-	12	50	
Sim	9	41,9	43	23,0		1	15	20	40		1	9,1	11	9,8		7	100	12	50	
Trombose					0,700					0,615					0,978					0,988
Não	21	95,5	168	89,2		4	100	44	88		10	90,9	102	90,2		7	100	22	91,6	
Sim	1	4,85	19	10,2		-	-	6	12		1	9,1	11	9,8		0	-	2	8,4	
Hemorragia					0,955					0,274					0,846					1
Não	19	86,4	161	86,1		2	50	38	76		10	90,9	80	87,9		4	100	17	70,8	
Sim	3	13,6	26	13,9		2	50	12	24		1	9,1	11	12,2		0	-	3	19,2	
Complicações vasculares					0,294					0,817					0,206					0,934
Não	19	86,4	136	72,7		2	50	28	56		11	100	90	79,6		6	85,7	18	75	
Sim	3	13,6	51	27,3		2	50	22	44		0	-	23	20,4		1	14,3	6	25	
JAK2 V617F					0,859					0,436					0,198					0,413
Não mutado	8	36,4	75	40,1		1	25	6	12		3	27,2	60	53,1		4	57,8	9	37,5	
Mutado	14	63,6	112	59,9		3	75	44	88		8	72,8	53	46,9		3	42,8	15	63,5	
Mutações emCALR					0,225					-					-					0,07
Não	2	28,6	36	60,0		-	-	-	-		0	-	28	57,1		0	0	6	66,7	
Sim	5	71,4	24	40,0		-	-	-	-		0	-	21	42,9		4	100	3	33,3	
Risco cardiovascular					0,249					0,964					0,98					0,889
Não	7	31,8	80	42,8		1	25	12	24		3	27,2	57	50,5		3	42,8	11	45,8	
Sim	15	69,2	107	57,2		3	75	38	76		8	72,8	56	49,5		4	57,8	13	55,2	
Sintomas constitucionais					0,882					0,594					0,328					0,889
Não	12	52,4	103	55,1		2	50	16	32		5	54,5	74	65,5		4	57,8	13	55,2	
Sim	10	47,6	84	44,9		2	50	34	68		6	45,5	39	34,5		3	42,8	11	45,8	
Idade (anos), mediana	60		57		0,066	59,5		63,3		0,861	63,8		52,8		0,049	58		57,9		0,527
Intervalo	47-95		4-86			53,8-76,7		21-84			47-83		4-86			50-95		25,4-84,2		
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	10,2		11,0		0,907	9,45		12,1		0,142	9,1		10		0,341	25,2		15,9		0,532
Intervalo	2,6-40,9		2,1-83,6			6,8-12,7		4,2-24,6			4,3-25,5		2,1-56			2,6-40,9		3,7-83,6		
Hematócrito (%), mediana	44		43,2		0,431	63,1		61,4		0,921	44		40,3		0,227	32		35,5		0,695
Intervalo	23,6-66,3		16,9-72,3			57-66,3		47,5-72,3			32,2-48		17-48			23,6-44		16,9-49		
Hemoglobina (g/dL), mediana	13,8		14,0		0,419	19,6		19,8		0,987	13,9		13,1		0,281	9,5		10,8		0,563
Intervalo	6,7-21,1		5,2-22,0			19,0-20,7		15,1-22,9			10,5-16		5,2-16			6,7-14,3		5,3-15,8		
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	648		758,5		0,143	470		523		0,689	830		906		0,415	390		349		0,729
Intervalo	121-2125		26-2445			132-711		159-1440			465-1236		114-2445			374-2125		26-1300		
LDH (U/L), mediana	505		513,5		0,311	602		553		0,844	411		412		0,893	1454		724		0,3
Intervalo	224-1777		163-3690			336-868		320-1240			224-908		163-1358			495-1777		252-3690		

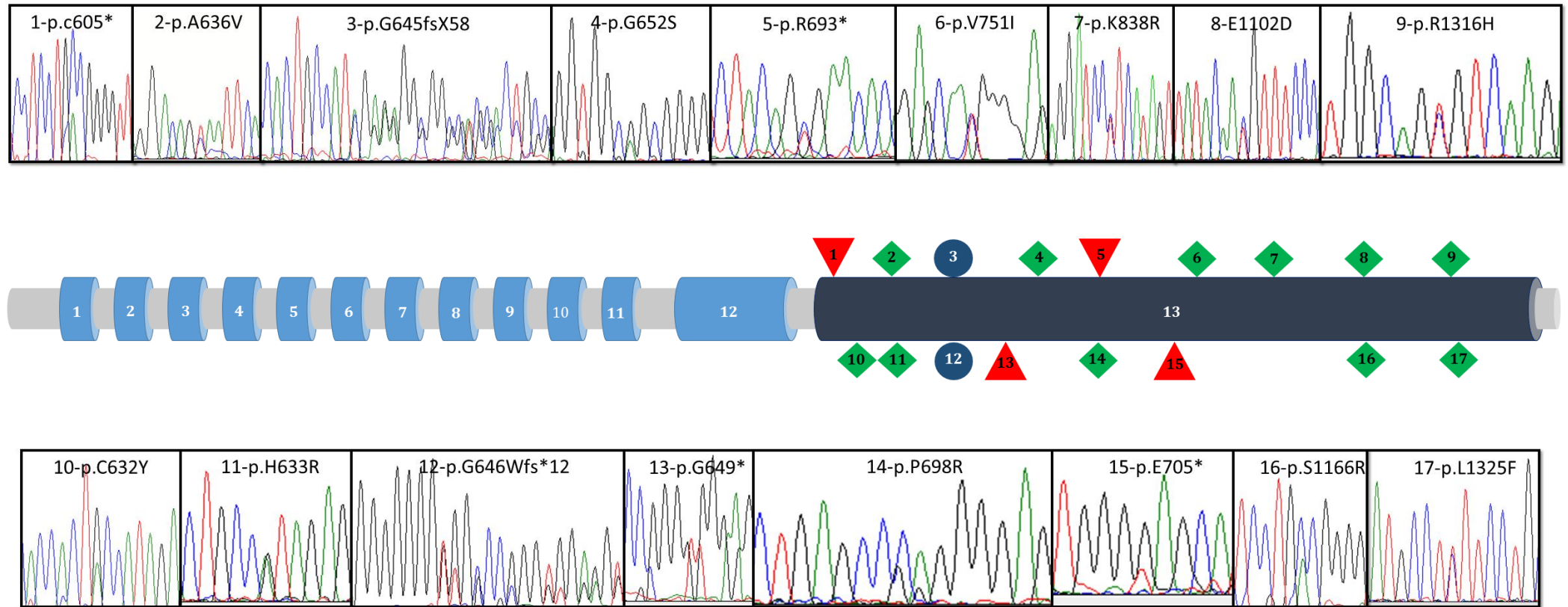


Figura 7: Classes e localizações de mutações no ASXL1 em pacientes com NMP. A pesquisa de mutações foi realizada no éxon 13 do ASXL1, observando-se 17 variações. Variações silenciosas não estão expostas. As posições sequenciais das mutações estão representadas no esquema, em que triângulos vermelhos representam mutações *nonsense*, círculos azuis as mutações *frameshift* e os losangos verdes variações *missenses*. Os eletroferogramas são ilustrativos das respectivas mutações e são referenciadas pelos numerais.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, realizamos a caracterização clínica e laboratorial de 264 pacientes com NMP Ph-negativo, dos quais, a pesquisa de mutações no gene *ASXL1* foi possível em 208 pacientes. No que concerne os dados produzidos, podemos conceituá-los sob dois aspectos: 1) composição clínica de nossos pacientes, 2) contextualização entre mutações no *ASXL1* e as características clínicas e laboratoriais dos referidos pacientes.

Nossa coorte é composta, principalmente, por pacientes com TE (57%;151/264) e PV (26%; 69/264), em que os pacientes com MFP representam um percentual menor (18%; 48/264). Estes dados estão em consonância com o estipulado epidemiologicamente para as NMP Ph-negativo, em que a frequência de MFP (0,4 casos/100.000 habitantes) é marcadamente menor que a de PV e TE (2,0 casos/100.000 habitantes) (Tefferi & Vardiman 2008; Kiladjian 2012; Tefferi 2014; Tefferi 2015). Com relação às características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos neste trabalho, evidenciamos duas características inerentes a este grupo de neoplasia hematológica. A primeira relaciona-se com as alterações patognomônicas a cada entidade, como o aumento da massa eritrocitária em pacientes com PV, plaquetose nos pacientes com TE e leucocitose na MFP. Estes achados suportam a efetividade dos critérios seguidos para diagnóstico das NMP incluídas no estudo (Kvasnicka 2013; Savona et al. 2015).

Apesar da uniformidade clínica e laboratorial dos pacientes, é indispensável denotar a heterogeneidade clínica entre os pacientes estudados, e, sobretudo, que esta é uma característica indissociável das NMP. Neste sentido, destacamos a prevalência dos sintomas constitucionais, compartilhados entre as entidades, assim como o risco aumentado de desenvolvimento de eventos

hemorrágicos, trombóticos e o desenvolvimento de complicações vasculares (Finazzi et al. 2013; Harrison & Garcia 2014; Geyer & Mesa 2015). Estes exemplos, embora frequentes, apresentam-se sob diferentes formas, e ao momento, não tivemos ferramentas clínicas nem tempo de seguimento necessário para avaliar o risco de desenvolvimento destas manifestações clínicas, em especial, a evolução clonal para leucemia aguda (Chen & Mullally 2011; Vardiman and Hyjek 2011).

A segunda característica foi com relação à pesquisa da mutação *JAK2V617F*. Esta mostrou-se como principal ferramenta diagnóstica às NMP Ph-negativo, principalmente por permitir a identificação de um marcador clonal para o grupo. A prevalência desta mutação em nossa coorte está de acordo com registros prévios da literatura (60%), tanto nacional (Silva et al. 2012) quanto internacional (Gotlib 2013; Takahashi et al. 2013; Pasquier et al. 2014; Zhang et al. 2014; Angona et al. 2015; Labastida-Mercado et al. 2015; Yonal-hindilerden et al. 2015). Esta pesquisa é especialmente importante para o diagnóstico da PV, uma vez que sua patogênese é virtualmente relacionada à mutações em *JAK2*, em nossa coorte a frequência de mutações foi de 91%, discretamente inferior ao proposto pela literatura, em que essa frequência é estipulada em 95% (Kiladjan 2012; Tefferi 2015). Para TE e MFP a *JAK2V617F* é também imprescindível ao diagnóstico, e apresentaram frequências de 49% e 58% nas entidades, respectivamente, também em concordância com a literatura (Kvasnicka 2013; Lekovic et al. 2015; Tefferi 2015).

Desenvolvemos, paralelamente a este trabalho, a padronização, e instituímos em nosso estado, a pesquisa de mutações no *CALR* em pacientes com NMP *JAK2V617F* negativos. Vinte e nove pacientes foram positivos para as

referidas mutações (45%; 29/65), em concordância com o preconizado em trabalhos prévios (Klampfl et al. 2013; Nangalia et al. 2013; Chi et al. 2014; Malcovati et al. 2014; Tefferi & Pardanani 2014). O oferecimento desta pesquisa ao centro de referência do estado de Pernambuco (Fundação HEMOPE) permitiu a redução do número de pacientes sem marcadores clonais, de 40% para 17% (36/208). Reiteramos a importância da identificação das mutações previamente citadas, uma vez que estabelecem critérios objetivos para subclassificação das entidades e minimizam as possibilidades de equívocos diagnósticos (Vardiman & Hyjek 2011; Kvasnicka 2013; Geyer et al. 2014).

Dos 264 pacientes analisados, 208 puderam ser categorizados quanto a mutações no *ASXL1*, dos quais 22 apresentaram-se mutados (10%). A maioria das mutações identificadas foram previamente descritas (Bejar et al. 2011; Gelsi-Boyer et al. 2012; Pratcorona et al. 2012; Shih et al. 2012; Abdel-Wahab & Levine 2013; Bejar et al. 2014). Duas mutações *missenses* foram identificadas em nosso estudo, em pacientes com TE (p.C632Y e p.P698R). Apesar de não terem sido previamente descritas e apresentarem, segundo a ferramenta *Polyphen-2*, uma alta probabilidade de dano molecular a função da proteína, o papel de mutações *missenses* sobre patogênese relacionada ao *ASXL1* é controverso (Thota et al. 2014; Paschka et al. 2015; Patnaik et al. 2016; Sorigué et al. 2016). Diversos autores apontam que apenas mutações dos tipos *nonsense* e *frameshift* possam interferir na função da *ASXL1*, uma vez que provocam a perda estrutural da extremidade C-terminal, com consequente extinção do domínio PHD (Abdel-wahab et al. 2013; Inoue et al. 2013; Wang et al. 2014). Outros, contudo, utilizam os critérios de inclusão utilizados em nosso trabalho (Bejar et al. 2014a; Cervera et al. 2014).

Quanto a frequência de mutações entre as entidades, observamos números em consonância com os relatados na literatura para PV, TE e MFP, 7%, 9% e 22%, respectivamente (Murati et al. 2012; Kim & Abdel-Wahab 2013; Sorigué et al. 2016). Identificamos ainda uma não associação entre as mutações no gene *ASXL1* e *JAK2 V617F* ($P = 0,859$) e *CALR* ($P = 0,225$). Este achado indica que as mutações no *ASXL1* exerçam um papel secundário na patogênese das NMP, postulando-se inclusive que sua participação ocorra como mutação condutora (do inglês *driver mutation*), precedendo a alteração oncogênica principal e favorecendo o estabelecimento deste clone (Brecqueville et al. 2014; Cerquozzi & Tefferi 2015; Valletta et al. 2015; Patnaik et al. 2016).

É importante destacar que o papel das mutações no gene *ASXL1* na fisiopatologia das NMP não é completamente entendido, apesar de terem sido extensamente estudado, especialmente em pacientes com MFP (Gelsi-Boyer et al. 2012; Murati et al. 2012, Bravo et al. 2014; Huether et al. 2014). A principal associação entre mutações no *ASXL1* e o estadiamento clínico das NMP é a predisposição à evolução clonal em pacientes com MFP (Shih et al. 2012). Com relação as demais entidades, os estudos são escassos e relacionados com a predisposição à evolução para mielofibrose (Cerquozzi & Tefferi 2015).

Em contrapartida, o impacto prognóstico de mutações no *ASXL1* em outras neoplasias mieloides estão mais bem estabelecidos. O *ASXL1* é o gene mais frequentemente mutado em pacientes com SMD e LMMC, com frequências estipuladas em 40% a 50% dos casos, para ambos grupos (Davids & Steensma 2010; Bejar et al. 2011; Cervera et al. 2014; Patnaik et al. 2015; Patnaik et al. 2016). A frequência em pacientes com LMA é consideravelmente menor, em torno de 5%-10% (Pratcorona et al. 2012; Devillier et al. 2015; Grimwade et al. 2015).

Apesar das diferentes frequências, as mutações no *ASXL1* estão associadas a piores sobrevida global e livre de eventos nas entidades supracitadas, assim como, os pacientes com SMD e LMMC, apresentam maiores taxas de evolução clonal para leucemias agudas (Shivarov et al. 2014; Bejar et al. 2014b; Devillier et al. 2015; Grimwade et al. 2015; Patnaik et al. 2016).

Do ponto de vista funcional, três trabalhos avaliaram a hematopoiese de modelos *knock-out* para o gene *ASXL1*, em todos foram observadas alterações morfológicas (displasias) em múltiplas linhagens e o desenvolvimento de sintomas relacionados às síndromes mielodisplásica, em que se destacam: citopenias em sangue periférico, anemia e aumento da apoptose na medula óssea, provocada por uma hematopoiese ineficiente (Abdel-Wahab et al. 2013; Inoue et al. 2013b; Wang et al. 2014).

Apesar do esforço crescente para identificação de marcadores de risco molecular, poucos estão estabelecidos ou tem reconhecimento suficiente para inclusão na prática clínica (Bravo et al. 2014; Guglielmelli et al. 2014a). O *ASXL1*, associado à mutações a outros modificadores epigenéticos, tais como, DNMT3A e TET2, é reconhecido como um dos mais frequentes e promissores genes alvos (Aumann & Abdel-Wahab 2014; Meldi & Figueroa 2015). Contudo, poucos estudos centraram esforços na identificação da possível modulação dos dados clínicos e demográficos dos pacientes com doenças onco-hematológicas segundo mutações nos genes citados acima (Pratcorona et al. 2012; Devillier et al. 2015; Sorigué et al. 2016). De acordo com nossos dados, não há diferença entre os grupos de pacientes mutados ou não para o *ASXL1* segundo as variáveis avaliadas, com exceção da idade avançada em pacientes com TE ($P = 0,049$) e o desenvolvimento de esplenomegalia ($P = 0,026$) nos pacientes com MFP.

É importante destacar que em nosso estudo, apenas três pacientes evoluíram para SMD e para LMA. Além disso, a probabilidade de evolução clonal em 10 anos para as entidades é relativamente baixa, em torno de 1% para TE, 4% para PV e 10% para MFP (Passamonti 2012; Rampal et al. 2014). Como a mediana de seguimento da nossa coorte é de apenas 5 anos, e até o presente momento não foi possível identificar um número significativo de pacientes com evolução clonal, nossas conclusões ficam limitadas às características ao diagnóstico e não devem ser extrapoladas ao prognóstico da doença.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A composição da coorte foi satisfatória, pois permitiu a identificação de pacientes de todas as entidades de NMP Ph-negativo, em proporções condizentes com a literatura, garantindo a representatividade das amostras;
- ✓ A frequência de mutações no gene *ASXL1* é similar ao descrito na literatura;
- ✓ Não houve diferenças significativas entre características clínicas e laboratoriais de pacientes com *ASXL1* mutado *versus* não mutado.

Referências

- Abdel-wahab O, Adli M, Lafave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R et al. (2012) Article ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell* 22:180-193.
- Abdel-Wahab O and Dey A (2013) The ASXL-BAP1 axis: new factors in myelopoiesis, cancer and epigenetics. *Leukemia* 27:10-15. doi: 10.1038/leu.2012.288
- Abdel-Wahab O, Gao J, Adli M, Dey A, Trimarchi T, Chung YR, Kucsu C, Hricik T, Ndiaye-Lobry D, Lafave LM et al. (2013) Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* 210:2641-2659. doi: 10.1084/jem.20131141
- Abdel-wahab O, Gao J, Adli M, Dey A, Trimarchi T, Chung YR, Kucsu C, Hricik T, Ndiaye-lobry D, Lafave LM et al. (2013) Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* 210:2641-2659. doi: 10.1084/jem.20131141
- Abdel-Wahab O and Levine RL (2013) Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* 121:3563-3572. doi: 10.1182/blood-2013-01-451781
- Angona A, Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, Camacho L, Fernández-Rodríguez C, Pairet S, Longarón R, Ancochea Á, Senín A et al. (2015) Hematopoietic clonal dominance, stem cell mutations, and evolutionary pattern of JAK2 V617F allele burden in polycythemia vera. *Eur J Haematol* 94:251-257. doi: 10.1111/ejh.12425
- Aumann S and Abdel-Wahab O (2014) Somatic alterations and dysregulation of epigenetic modifiers in cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 455:24-34. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.004
- Balasubramani A, Larjo A, Bassein JA, Chang X, Hastie RB, Togher SM, Lähdesmäki H and Rao A (2015) Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nat Commun* 6:7307. doi: 10.1038/ncomms8307
- Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O and Hubbard SR (2012) Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol* 19:754-759. doi: 10.1038/nsmb.2348
- Barbui T, Thiele J, Vannucchi A and Tefferi A (2013) Rethinking the diagnostic criteria of polycythemia vera. *Leukemia* 28:1191-1195. doi: 10.1038/leu.2013.380

- Barosi G, Tefferi A, Besses C, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Gisslinger H, Griesshammer M, Harrison C, Hehlmann R et al. (2014) Clinical end points for drug treatment trials in BCR-ABL1-negative classic myeloproliferative neoplasms: consensus statements from European LeukemiaNET (ELN) and International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT). *Leukemia* 29:20–26. doi: 10.1038/leu.2014.250
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N et al. (2005) Mechanisms of Disease Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054–1061.
- Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-natan M, Pérez-ladaga A, Wang H, Caughey B, Stojanov P, Getz G, Garcia-manero G et al. (2014a) TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *124:2705–2712*. doi: 10.1182/blood-2014-06-582809
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D et al. (2011) Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 364:2496–2506. doi: 10.1056/NEJMoa1013343
- Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, Lindsley RC, Mar BG, Stojanov P, Getz G, Steensma DP, Ritz J, Soiffer R et al. (2014b) Somatic Mutations Predict Poor Outcome in Patients With Myelodysplastic Syndrome After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 32:1–9. doi: 10.1200/JCO.2013.52.3381
- Bravo GM, Lee E, Merchan B, Kantarjian HM and García-Manero G (2014) Integrating genetics and epigenetics in myelodysplastic syndromes: Advances in pathogenesis and disease evolution. *Br J Haematol* 166:646–659. doi: 10.1111/bjh.12957
- Brecqueville M, Rey J, Devillier R, Guille A, Gillet R, Adélaide J, Gelsi-Boyer V, Arnoulet C, Chaffanet M, Mozziconacci MJ et al. (2014) Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica* 99:37–45. doi: 10.3324/haematol.2013.091454
- Cerquozzi S and Tefferi A (2015) Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer J* 5:e366. doi: 10.1038/bcj.2015.95
- Cervera N, Itzykson R, Coppin E, Prebet T, Murati A, Legall S, Vey N, Solary E, Birnbaum D and Gelsi-Boyer V (2014) Gene mutations differently impact the prognosis of the myelodysplastic and myeloproliferative classes of chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol* 89:604–609. doi: 10.1002/ajh.23702

- Chen E and Mullally A (2011) How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 268:276.
- Chi J, Nicolaou K a, Nicolaidou V, Koumas L, Mitsidou a, Pierides C, Manoloukos M, Barbouti K, Melanthiou F, Prokopiou C et al. (2014) Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia* 28:1152-4. doi: 10.1038/leu.2013.382
- Chung YR, Schatoff E and Abdel-Wahab O (2012) Epigenetic alterations in hematopoietic malignancies. *Int J Hematol* 96:413-427. doi: 10.1007/s12185-012-1181-z
- da Costa Reis Monte-Mór B, da Cunha AF, Pagnano KBB, Saad ST, Lorand-Metze I and Costa FF (2007) JAK2 V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Genet Mol Biol* 30:336-338. doi: 10.1590/S1415-47572007000300006
- Daids MS and Steensma DP (2010) The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther* 10:309-319. doi: 10.4161/cbt.10.4.12612
- Devillier R, Mas VM, Gelsi-boyer V, Demur C, Murati A, Corre J, Prebet T, Bertoli S, Mozziconacci M, Delabesse E et al. (2015) Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget* 6:8388-8396.
- Enblom A, Lindskog E, Hasselbalch H, Hersby D, Bak M, Tetu J, Girodon F and Andréasson B (2015) High rate of abnormal blood values and vascular complications before diagnosis of myeloproliferative neoplasms. *Eur J Intern Med*. doi: 10.1016/j.ejim.2015.03.009
- Engle EK, Fisher D a C, Miller C a, McLellan MD, Fulton RS, Moore DM, Wilson RK, Ley TJ and Oh ST (2014) Clonal evolution revealed by whole genome sequencing in a case of primary myelofibrosis transformed to secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1-8. doi: 10.1038/leu.2014.289
- Finazzi G, De Stefano V and Barbui T (2013) Are MPNs vascular diseases? *Curr Hematol Malig Rep* 8:307-316. doi: 10.1007/s11899-013-0176-z
- Fisher CL, Berger J, Randazzo F and Brock HW (2003) A human homolog of Additional sex combs, ADDITIONAL SEX COMBS-LIKE 1, maps to chromosome 20q11. *Gene* 306:115-126. doi: 10.1016/S0378-1119(03)00430-X
- Fisher CL, Pineault N, Brookes C, Helgason CD, Ohta H, Bodner C, Hess JL, Humphries RK and Brock HW (2010) Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood* 115:38-47. doi: 10.1182/blood-2009-07-

230698.The

- Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, Van Dyke D, Hanson C, Wu W, Pardani A et al. (2011) DIPSS plus: A refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol* 29:392-397. doi: 10.1200/JCO.2010.32.2446
- Gardai SJ, McPhillips K a., Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M and Henson PM (2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.032
- Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci M-J and Birnbaum D (2012) Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol* 5:12. doi: 10.1186/1756-8722-5-12
- Geyer HL and Mesa RA (2015) Therapy for myeloproliferative neoplasms : when , which agent , and how ? *Blood* 124:277-286. doi: 10.1182/blood-2014-05-577635.This
- Geyer HL, Scherber RM, Dueck AC, Kiladjian JJ, Xiao Z, Slot S, Zweegman S, Sackmann F, Fuentes AK, Hernández-Maraver D et al. (2014) Distinct clustering of symptomatic burden among myeloproliferative neoplasm patients: Retrospective assessment in 1470 patients. *Blood* 123:3803-3810. doi: 10.1182/blood-2013-09-527903
- Gotlib J (2013) JAK inhibition in the myeloproliferative neoplasms: lessons learned from the bench and bedside. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013:529-37. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.529
- Grimwade D, Ivey A and Huntly BJP (2015) Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 127:29-42. doi: 10.1182/blood-2015-07-604496
- Grisouard J, Shimizu T, Duek a., Kubovcakova L, Hao-Shen H, Dirnhofer S and Skoda RC (2015) Deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhances thrombocytosis and shortens survival in a JAK2-V617F mouse model of MPN. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2014-08-594572
- Grünebach F, Bross-Bach U, Kanz L and Brossart P (2006) Detection of a new JAK2 D620E mutation in addition to V617F in a patient with polycythemia vera. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 20:2210-2211. doi: 10.1038/sj.leu.2404419
- Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi a, Biamonte F, Pardani a, Zoi K, Reiter a et al. (2014a) The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis:

an international study of 797 patients. *Leukemia* 1ñ7. doi: 10.1038/leu.2014.76

- Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR and Vannucchi AM (2014b) *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms: Hidden behind the reticulum: *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. *Am J Hematol* 89:n/añn/a. doi: 10.1002/ajh.23678
- Harrison CN and Garcia NC (2014) Management of MPN beyond JAK2. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 348ñ354.
- Hoischen A, van Bon BWM, Rodríguez-Santiago B, Gilissen C, Vissers LELM, de Vries P, Janssen I, van Lier B, Hastings R, Smithson SF et al. (2011) De novo nonsense mutations in *ASXL1* cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet* 43:729ñ31. doi: 10.1038/ng.868
- Huether R, Dong L, Chen X, Wu G, Parker M, Wei L, Ma J, Edmonson MN, Hedlund EK, Rusch MC et al. (2014) The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun* 5:3630. doi: 10.1038/ncomms4630
- Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K et al. (2013) Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering *ASXL1* mutations. *J Clin Invest* 123:4627ñ4640. doi: 10.1172/JCI70739
- Katoh M (2013) Functional and cancer genomics of *ASXL* family members. *Br J Cancer* 109:299ñ306. doi: 10.1038/bjc.2013.281
- Kiladjian J-J (2012) The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012:561ñ6. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.561
- Kim E and Abdel-Wahab O (2013) Focus on the epigenome in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013:538ñ44. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.538
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NCC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D et al. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 369:2379ñ90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347
- Kralovics R, Passamonti F, Buser A, Soon-Siong T, Tirdt R, Passweg J, Tichelli A, Cazzola M and Skoda RC (2005) A Gain-of-Function Mutation of Mutation of *JAK2* in Myeloproliferatives Neoplasms. *N Engl J Med* 1779ñ1790.
- Kvasnicka HM (2013) WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update. *Curr Hematol Malig Rep* 8:333ñ341. doi: 10.1007/s11899-013-0186-x

- Labastida-Mercado N, Galindo-Becerra S, Garcés-Eisele J, Colunga-Pedraza P, Guzman-Olvera V, Reyes-Nuñez V, Ruiz-Delgado GJ and Ruiz-Argüelles GJ (2015) The mutation profile of JAK2, MPL and CALR in Mexican patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 1ñ6. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.12.002
- Lee SW, Cho YS, Na JM, Park UH, Kang M, Kim EJ and Um SJ (2010) ASXL1 represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LSD1. *J Biol Chem* 285:18ñ29. doi: 10.1074/jbc.M109.065862
- Lee T-S, Ma W, Zhang X, Kantarjian H and Albitar M (2009) Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC Struct Biol* 9:58. doi: 10.1186/1472-6807-9-58
- Lekovic D, Gotic M, Sefer D, Mitrovic-Ajtic O, Cokic V and Milic N (2015) Predictors of survival and cause of death in patients with essential thrombocythemia. *Eur J Haematol* n/añn/a. doi: 10.1111/ejh.12517
- Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, Guo G, Hao-Shen H, Dirnhofer S, Orkin SH, Manz MG and Skoda RC (2014) Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J Exp Med* 211:2213ñ2230. doi: 10.1084/jem.20131371
- Ma W, Kantarjian H, Zhang X, Yeh C-H, Zhang ZJ, Verstovsek S and Albitar M (2009) Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J Mol Diagn* 11:49ñ53. doi: 10.2353/jmoldx.2009.080114
- Malcovati L, Rumi E and Cazzola M (2014) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 99:1650ñ1652. doi: 10.3324/haematol.2014.113944
- Mascarenhas JO, Orazi A, Bhalla KN, Champlin RE, Harrison C and Hoffman R (2013) Advances in myelofibrosis: A clinical case approach. *Haematologica* 98:1499ñ1509. doi: 10.3324/haematol.2013.086348
- Meldi KM and Figueroa ME (2015) Epigenetic deregulation in myeloid malignancies. *Translacional Res* 102ñ114.
- Mughal TI, Vannucchi AM, Soverini S, Bazeos A, Tibes R, Saglio G, Abdel-Wahab O, Pardanani A, Hehlmann R, Barbui T et al. (2014) Current pre-clinical and clinical advances in the BCR-ABL1-positive and -negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 99:797ñ801. doi: 10.3324/haematol.2013.097832
- Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci M-J, Gelsi-Boyer V and Birnbaum D (2012) Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer* 12:304. doi: 10.1186/1471-2407-12-304
- Nangalia J and Green TR (2014) The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*

287ñ296.

- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG et al. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 369:2391ñ405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542
- Nemer W El, Grandis M De and Brusson M (2014) Abnormal adhesion of red blood cells in polycythemia vera: A prothrombotic effect? *Thromb Res* 133:107ñ111. doi: 10.1016/S0049-3848(14)50018-7
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa R a., Wadleigh M, Steensma DP, Elliott M a., Wolanskyj AP, Hogan WJ et al. (2006) MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood* 108:3472ñ3476. doi: 10.1182/blood-2006-04-018879
- Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, Spath D, Teleanu V, Kundgen a., Kohne C-H et al. (2015) ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica* 100:324ñ330. doi: 10.3324/haematol.2014.114157
- Pasquier F, Cabagnols X, Secardin L, Plo I and Vainchenker W (2014) Myeloproliferative Neoplasms: JAK2 Signaling Pathway as a Central Target for Therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 14:S23ñS35. doi: 10.1016/j.clml.2014.06.014
- Passamonti F (2012) Classification of Myeloproliferative Neoplasms and Prognostic Factors. *ASCO Univ Educ Ser* 419ñ424.
- Passamonti F, Mora B and Maffioli M (2016) New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol* 23:137ñ143. doi: 10.1097/MOH.0000000000000218
- Patnaik MM, Lasho TL, Vijayvargiya P, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N and Tefferi A (2016) Prognostic interaction between ASXL1 and TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J* 6:e385ñ5. doi: 10.1038/bcj.2015.113
- Patnaik MM, Wassie EA, Lasho TL, Hanson CA and Tefferi A (2015) Blast Transformation in Chronic Myelomonocytic Leukemia : Risk Factors , Genetic Features , Survival and Treatment Outcome. *Am J Hematol* 1ñ18.
- Poletto V, Rosti V, Villani L, Catarsi P, Carolei A, Campanelli R, Massa M, Martinetti M, Viarengo G, Malovini A et al. (2012) A3669G polymorphism of glucocorticoid receptor is a susceptibility allele for primary myelofibrosis and contributes to phenotypic diversity and blast transformation. *Blood* 120:3112ñ3117. doi: 10.1182/blood-2012-05-433466
- Pratcorona M, Abbas S, Sanders M a., Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren C a J, Zeilemakers A, Löwenberg B and Valk PJM (2012) Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: Prevalence and

prognostic value. Haematologica 97:388-392. doi: 10.3324/haematol.2011.051532

- Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, Nahas M, Wang K, Lipson D, Otto G a., Yelensky R, Hricik T, McKenney AS et al. (2014) Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci* 111:E5401-E5410. doi: 10.1073/pnas.1407792111
- Russell B, Johnston JJ, Biesecker LG, Kramer N, Pickart A, Rhead W, Tan WH, Brownstein CA, Kate Clarkson L, Dobson A et al. (2015) Clinical management of patients with ASXL1 mutations and Bohring-Opitz syndrome, emphasizing the need for Wilms tumor surveillance. *Am J Med Genet Part A* 167:2122-2131. doi: 10.1002/ajmg.a.37131
- Savona MR, Malcovati L, Komrokji R, Tiu R V., Mughal TI, Orazi a., Kiladjian J-J, Padron E, Solary E, Tibes R et al. (2015) An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. *Blood* 125:1857-1865. doi: 10.1182/blood-2014-10-607341
- Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, Ly-Hartig N, McGinty RK, Fraterman S, Wilm M, Muir TW and Müller J (2010) Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 465:243-247. doi: 10.1038/nature08966
- Schnittger S, Bacher U, Kern W, Schröder M, Haferlach T and Schoch C (2006) Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 20:2195-2197. doi: 10.1038/sj.leu.2404325
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ and Green AR (2007) Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N Engl J Med* 357:1457-1457. doi: 10.1056/NEJMx070051
- Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP and Levine RL (2012) The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 12:599-612. doi: 10.1038/nrc3343
- Shivarov V, Gueorguieva R, Ivanova M and Tiu R V (2014) ASXL1 mutations define a subgroup of AML patients with distinct gene expression profile and poor prognosis: a meta-analysis of 3311 adult AML patients. *Leuk Lymphoma* 1-11. doi: 10.3109/10428194.2014.974596
- Silva RR Da, Domingues Hatzlhofer BL, Machado CGDF, Lima ASDM, de Albuquerque DM, Santos MNN Dos, Fertrin KY, Costa FF, Araújo ADS and Bezerra MAC (2012) Mutation Prevalence in Myeloproliferative Neoplasms in Pernambuco, Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers* 16:802-805. doi: 10.1089/gtmb.2011.0272
- Sinclair D a, Milne T a, Hodgson JW, Shellard J, Salinas C a, Kyba M, Randazzo F and Brock HW (1998a) The Additional sex combs gene of *Drosophila*

encodes a chromatin protein that binds to shared and unique Polycomb group sites on polytene chromosomes. *Development* 125:1207–1216.

Sinclair D a R, Clegg NJ, Antonchuk J, Milne T a., Stankunas K, Ruse C, Grigliatti T a., Kassis J a. and Brock HW (1998b) Enhancer of Polycomb is a suppressor of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148:211–220.

Sorigué M, Ribera J, Garc O, Marc S, Buch J, Plensa E, Gallardo D, Xicoy B and Fern C (2016) Highly variable mutational profile of ASXL1 in myelofibrosis. *Eur J Haematol* 1–5. doi: 10.1111/ejh.12731

Steensma DP, Caudill JSC, Pardanani A, McClure RF, Lasho TL and Tefferi A (2006) MPL W515 and JAK2 V617 mutation analysis in patients with refractory anemia with ringed sideroblasts and an elevated platelet count. *Haematologica* 91:155–156.

Takahashi K, Patel KP, Kantarjian H, Luthra R, Pierce S, Cortes J and Verstovsek S (2013) JAK2 p.V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood* 122:3784–3786. doi: 10.1182/blood-2013-07-515676

Tefferi a and Vardiman JW (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 22:14–22. doi: 10.1038/sj.leu.2404955

Tefferi A (2015) CME Information: Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematology J H* 90:162–173. doi: 10.1002/ajh.00043

Tefferi A (2014) Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 89:97–108. doi: 10.1002/ajh.00030

Tefferi A, Noel P and Hanson C a. (2011) Uses and abuses of JAK2 and MPL mutation tests in myeloproliferative neoplasms: A paper from the 2010 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagnostics* 13:461–466. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.05.007

Tefferi A and Pardanani A (2016) Myeloproliferative Neoplasms A Contemporary Review. *JAMA Oncol* 1:97–105. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.89

Tefferi A and Pardanani A (2014) Genetics: CALR mutations and a new diagnostic algorithm for MPN. *Nat Rev Clin Oncol* 11:125–136. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.16

Tefferi A, Wassie E a., Guglielmelli P, Gangat N, Belachew A a., Lasho TL, Finke C, Ketterling RP, Hanson C a., Pardanani A et al. (2014) Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study

of 1027 patients. *Am J Hematol* 89:121–124. doi: 10.1002/ajh.23743

Thota S, Viny AD, Makishima H, Spitzer B, Radivoyevitch T, Przychodzen B, Sekeres M a, Levine RL and Maciejewski JP (2014) Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood* 124:1790–1799. doi: 10.1182/blood-2014-04-567057

Toms A V, Deshpande A, McNally R, Jeong Y, Rogers JM, Kim CU, Gruner SM, Ficarro SB, Marto J a, Sattler M et al. (2013) Structure of a pseudokinase-domain switch that controls oncogenic activation of Jak kinases. *Nat Struct Mol Biol* 20:1221–1223. doi: 10.1038/nsmb.2673.Structure

Vainchenker W and Constantinescu SN (2012) REVIEW JAK / STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* 1–13. doi: 10.1038/onc.2012.347

Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, Yip BH, Bello E, Gordon S, Yu Y, Shaw J, Roy S, Scifo L et al. (2015) ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.6392

Vardiman J and Hyjek E (2011) World Health Organization Classification, Evaluation, and Genetics of the Myeloproliferative Neoplasm Variants. *Hematology* 2011:250–256. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.250

Wang J, Li Z, He Y, Pan F, Chen S, Rhodes S, Nguyen L, Yuan J, Jiang L, Yang X et al. (2014) Loss of Asxl1 leads to myelodysplastic syndrome – like disease in mice. *Blood* 123:541–554. doi: 10.1182/blood-2013-05-500272.J.W.

Yonal-hindilerden I, Daglar-aday A, Akadam-teker B, Yilmaz C and Nalcaci M (2015) The Burden of JAK2V617F Mutated Allele in Turkish Patients With Myeloproliferative Neoplasms. *J Clin Med Res* 7:161–170.

Zhang S, Li H and Lai R (2014) Detection of JAK2 V617F mutation increases the diagnosis of myeloproliferative neoplasms. *Oncol Lett* 735–738. doi: 10.3892/ol.2014.2801

Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB and Zhao ZJ (2005) Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 280:22788–22792. doi: 10.1074/jbc.C500138200

8. Anexo A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****MAIORES DE 18 ANOS****(resolução 466/12)**

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa "Impacto prognóstico do ASXL1 em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas ", que está sob a responsabilidade do pesquisador Juan Luiz Coelho da Silva (Endereço: Rua 85, Quadra 63, Bloco 12, nº 55, apto. 308, Maranguape 1, Paulista, PE, CEP: 53441-310 ã Fone: (81) 8212-3548 ã E-mail: juanluiz.coelho@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo (81) 9908-9382 - araujoarl@hotmail.com). Também participam também desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo (81) 9976-5136 - aderson@hotlink.com.br), Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (81) 9800-8105 ã macbezerraufpe@gmail.com).

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o(a) Sr.(a) não será penalizado(a) de forma alguma. O(a) Sr.(a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

Nós verificamos que as Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas são doenças clonais com sintomas severos ao bem estar do paciente, podendo causar hipertensão arterial sistêmica, trombose e hemorragia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas permitirá a detecção precoce e estratificação de risco destes pacientes. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, possa haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n ã 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 ã e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

Impacto prognóstico do ASXL1 em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo "Impacto prognóstico do ASXL1 em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas ", como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data

Assinatura do participante

Impressão Digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

8. ANEXO B

	Comitê de Ética em Pesquisa Av. Joaquim Nabuco, 171 Graças Recife-PE CEP: 52011-000- Tel.: (81) 3182-4771 Correio-e: cep_hemope@gmail.com	
---	---	--

1 - DADOS SOBRE O PROJETO**PARECER FINAL: Nº. 013/2009**

Título do Projeto: Prevalência da Mutação JAK2 em Pacientes em Síndromes Mieloproliferativas Crônicas Atendidos na Fundação Hemope.

Instituição Solicitante: Faculdade Maurício de Nassau

Pesquisadora: Aderson da Silva Araújo

Identidade: 888.191SSP-PE **CPF:** 064.073.904-00 **Telefone:** 81 – 3182-4695

Finalidade: Conclusão do Curso de Bacharel em Biomedicina

Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia- Unilabe.

Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Orientado: Rafael Ramos da Silva

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Determinar a prevalência da mutação JAK2 V617F em pacientes com síndromes mieloproliferativas crônicas BCR/ABL negativas atendidos no Hospital de Hematologia e Hemoterapia da Fundação Hemope.

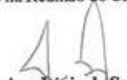
Objetivos Específicos: Padronizar no Laboratório na Unidade de Laboratórios Especializados da Fundação Hemope (UNILABE) a técnica descrita na literaturas para detecção da Mutação JAK2 V617F; Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com policitemia vera; Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com trombocitemia essencial e Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com mielofibrose.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 013/09, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 27/5/2009


Ana Lúcia de Sena
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa-HEMOPE

8. Anexo C

Tabela suplementar 1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP de acordo com os resultados de mutações no gene *ASXL1* (com resultados *versus* sem resultados)

Características	Pacientes com resultados de <i>ASXL1</i> (n = 208)		Pacientes sem resultados de <i>ASXL1</i> (n = 56)		P-valor
	No.	%	No.	%	
Sexo					0,833
Mulher	140	67,3	31	55,3	
Homem	68	32,7	25	44,7	
Necessidade transfusional					0,402
Não	179	86	53	94,6	
Sim	29	14	3	5,4	
Esplenomegalia					0,818
Não	137	65,9	35	62,5	
Sim	71	34,1	21	37,5	
Trombose					0,356
Não	188	90,3	53	94,6	
Sim	20	9,7	3	5,4	
Hemorragia					0,616
Não	176	84,6	51	91,9	
Sim	32	15,4	5	8,1	
Complicações vasculares					0,836
Não	154	74,1	48	85,7	
Sim	54	25,9	8	14,3	
JAK2 V617F					1,000
Não mutado	84	40,4	23	41	
Mutado	124	59,6	33	59	
Risco cardiovascular					0,683
Não	86	41,3	20	35,7	
Sim	122	58,7	36	64,3	
Sintomas constitucionais					0,171
Não	115	55,3	37	66,1	
Sim	93	44,7	19	33,9	
Idade (anos), mediana	59		62,3		0,536
Intervalo	21,6 ã 82,2		23,4 ã 86,1		
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	11,1		10,9		0,621
Intervalo	2,1 ã 56,2		3,8 ã 36,7		
Hematócrito (%), mediana	46		43,8		0,51
Intervalo	23 ã 72		17 ã 67		
Hemoglobina (g/dL), mediana	14,5		43,8		0,633
Intervalo	7,2 ã 22,4		17 ã 67		
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	730		660		0,254
Intervalo	35 ã 2291		26 ã 1517		
LDH (U/L), mediana	610		474		0,118
Intervalo	204 ã 3690		246 ã 1133		

8. Anexo D

Artigo 1: Colaboração

Periódico **Blood**: IF10,452

Qualis Capes Ciências Biológicas 1-A1

High $\Delta NP73/TAp73$ ratio is associated with poor prognosis in acute promyelocytic leukemia

Antonio R. Lucena-Araujo, Haesook T. Kim, Carolina Thomé, Rafael H. Jacomo, Raul A. Melo, Rosane Bittencourt, Ricardo Pasquini, Katia Pagnano, Ana Beatriz F. Glória, Maria de Lourdes Chauffaille, Melina Athayde, Carlos S. Chiattonne, Ingrid Mito, Rodrigo Bendlin, Carmino Souza, Cristina Bortolheiro, Juan L. Coelho-Silva, Stanley L. Schrier, Martin S. Tallman, David Grimwade, Arnold Ganser, Nancy Berliner, Raul C. Ribeiro, Francesco Lococo, Bob Lowenberg, Miguel A. Sanz e Eduardo M. Rego.

Brief Report

MYELOID NEOPLASIA

High Δ Np73/TAp73 ratio is associated with poor prognosis in acute promyelocytic leukemia

Antonio R. Lucena-Araujo,¹ Haesook T. Kim,² Carolina Thomé,¹ Rafael H. Jacomo,¹ Raul A. Melo,³ Rosane Bittencourt,⁴ Ricardo Pasquini,⁵ Katia Pagnano,⁶ Ana Beatriz F. Glória,⁷ Maria de Lourdes Chauffaille,⁸ Melina Athayde,⁷ Carlos S. Chiatone,⁹ Ingrid Mito,⁴ Rodrigo Bendlin,⁵ Camilo Souza,⁶ Cristina Bortolheiro,⁹ Juan L. Coelho-Silva,¹⁰ Stanley L. Schrier,¹¹ Martin S. Tallman,¹² David Grimwade,¹³ Arnold Ganser,¹⁴ Nancy Berliner,¹⁵ Raul C. Ribeiro,¹⁶ Francesco Lo-Coco,^{17,18} Bob Löwenberg,¹⁹ Miguel A. Sanz,²⁰ and Eduardo M. Rego¹

¹Department of Internal Medicine, Medical School of Ribeirão Preto and Center for Cell Based Therapy, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil;

²Department of Biostatistics and Computational Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; ³Department of Internal Medicine, University of Pernambuco and Fundação HEMOPE, Recife, Brazil; ⁴Hematology Division, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁵Hematology Division, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ⁶Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, Brazil; ⁷Hematology Division, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁸Hematology and Transfusion Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁹Hematology Division, Santa Casa Medical School, São Paulo, Brazil; ¹⁰Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ¹¹Department of Medicine, Stanford University, Stanford, CA; ¹²Leukemia Service, Memorial Sloan Kettering Cancer Center/Weill Cornell Medical College, New York, NY; ¹³Department of Medical and Molecular Genetics, King's College London School of Medicine, London, United Kingdom; ¹⁴Department of Hematology, Hannover Medical School, Hannover, Germany; ¹⁵Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA; ¹⁶Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN; ¹⁷Department of Biopathology, University Tor Vergata, Rome, Italy; ¹⁸Santa Lucia Foundation, Rome, Italy; ¹⁹Department of Hematology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands; and ²⁰Department of Hematology, Valencia University Medical School, Valencia, Spain

Key Points

- High Δ Np73/TAp73 expression ratio is associated with lower overall survival and higher cumulative incidence of relapse in APL.
- Δ Np73/TAp73 expression ratio is an independent prognostic marker in APL.

The *TP73* gene transcript is alternatively spliced and translated into the transcriptionally active (TAp73) or inactive (Δ Np73) isoforms, with opposite effects on the expression of p53 target genes and on apoptosis induction. The imbalance between Δ Np73 and TAp73 may contribute to tumorigenesis and resistance to chemotherapy in human cancers, including hematologic malignancies. In acute promyelocytic leukemia (APL), both isoforms are expressed, but their relevance in determining response to therapy and contribution to leukemogenesis remains unknown. Here, we provide the first evidence that a higher Δ Np73/TAp73 RNA expression ratio is associated with lower survival, lower disease-free survival, and higher risk of relapse in patients with APL homogeneously treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy, according to the International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia (IC-APL) study. Cox proportional hazards modeling showed that a high Δ Np73/TAp73 ratio was independently associated with shorter overall survival

(hazard ratio, 4.47; 95% confidence interval, 1.64-12.2; $P = .0035$). Our data support the hypothesis that the Δ Np73/TAp73 ratio is an important determinant of clinical response in APL and may offer a therapeutic target for enhancing chemosensitivity in blast cells. (*Blood*. 2015;126(20):2302-2306)

Introduction

Accumulating evidence suggests that an imbalance between Δ Np73 and TAp73 proteins (both isoforms encoded by the *TP73* gene) may contribute to both tumorigenesis and resistance to chemotherapy.¹ Although the full-length TAp73 largely mimics p53 activities in experimental systems,² the transactivation-deficient Δ Np73 isoform, by competition with p53 for DNA binding sites³ and/or Δ Np73 oligomerization with TAp73,⁴ exerts a dominant-negative effect on their functions. Overexpression of the Δ Np73 transcript has been associated with adverse prognosis and chemotherapy failure in several human tumors,⁵ including hematologic malignancies.⁶ Higher expression of Δ Np73 in

relation to TAp73 transcripts (Δ Np73/TAp73 ratio) was previously associated with in vitro resistance to cytarabine-induced apoptosis in leukemic blast cells.⁷ Particularly in patients with acute promyelocytic leukemia (APL), the Δ Np73/TAp73 ratio varies substantially,⁷ but the clinical significance of this variation remains unclear. Here, we retrospectively quantified Δ Np73 and TAp73 transcript levels in samples from patients with APL treated in the International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia (IC-APL) study⁸ and correlated these findings with clinical and laboratory features, hematologic recovery, relapse, and survival.

Submitted January 23, 2015; accepted September 11, 2015. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 1, 2015; DOI 10.1182/blood-2015-01-623330.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2015 by The American Society of Hematology

Table 1. Clinical and baseline characteristics

Characteristic	All patients	Δ Np73/TAp73 ratio		P
		Low expression	High expression	
Sex, no. (%)				.07
Female	69 (53.5)	56 (58.3)	13 (39.4)	
Male	60 (46.5)	40 (41.7)	20 (60.6)	
Age, median (range), y	34 (9, 73)	34 (16, 73)	31 (9, 60)	.75
ECOG performance status, no. (%)				.12
0	81 (62.8)	64 (66.7)	17 (51.5)	
1	22 (17.1)	16 (16.7)	6 (18.2)	
2	15 (11.6)	11 (11.5)	4 (12.1)	
≥ 3	11 (8.5)	5 (5.2)	6 (18.2)	
Relapse-risk group, no. (%)				<.0001
High	45 (34.9)	23 (24)	22 (66.7)	
Intermediate	61 (47.3)	51 (53.1)	10 (30.3)	
Low	23 (17.8)	22 (22.9)	1 (3)	
Morphologic subtype, no. (%)				.37
Hypergranular	122 (94.6)	92 (95.8)	30 (90.9)	
Microgranular	7 (5.4)	4 (4.2)	3 (9.1)	
PML breakpoint, no. (%)				.24
BCR1	70 (54.3)	54 (56.3)	16 (48.5)	
BCR2	3 (2.3)	3 (3.1)	—	
BCR3	44 (34.1)	29 (30.2)	15 (45.5)	
Unknown	12 (9.3)	10 (10.4)	2 (6.1)	
Fever, no. (%)				.31
No	66 (51.2)	52 (54.2)	14 (42.4)	
Yes	63 (48.8)	44 (45.8)	19 (57.6)	
WBC counts, no. (%), $\times 10^9/L$				.0002
≤ 5	68 (52.7)	59 (61.5)	9 (27.3)	
5-10	16 (12.4)	14 (14.6)	2 (6.1)	
10-50	32 (24.8)	17 (17.7)	15 (45.5)	
> 50	13 (1.1)	6 (6.3)	7 (21.2)	
Median (range)	4.3 (0.2, 13.2)	2.9 (0.2, 102.7)	23.7 (0.5, 132.5)	
Platelet counts, no. (%), $\times 10^9/L$				.40
≤ 40	96 (74.4)	73 (76)	23 (69.7)	
> 40	33 (25.6)	23 (24)	10 (30.3)	
Median (range)	27 (3, 128)	27 (4, 128)	30 (3, 99)	
Hemoglobin, no. (%), g/dL				.15
≤ 10	99 (76.7)	77 (80.2)	22 (66.7)	
> 10	30 (23.3)	19 (19.8)	11 (33.3)	
Median (range)	8.7 (3.4, 14.1)	8.7 (4.4, 14.1)	9.5 (3.4, 12.5)	
Creatinine, no. (%), mg/dL				.65
≤ 1.4	123 (95.3)	92 (95.8)	31 (93.9)	
> 1.4	6 (4.7)	4 (4.2)	2 (6.1)	
Median (range)	0.8 (0.3, 4.3)	0.8 (0.3, 4.3)	0.9 (0.4, 1.9)	
Uric acid, no. (%), mg/dL				.32
≤ 7	114 (88.4)	82 (85.4)	32 (97)	
> 7	5 (3.9)	5 (5.2)	—	
Unknown	10 (7.8)	9 (9.4)	1 (3)	
Median (range)	3.7 (0.8, 9.2)	3.6 (0.8, 9.2)	4.2 (2.1, 6.6)	
Fibrinogen, no. (%), mg/dL				.66
≤ 170	70 (54.3)	51 (53.1)	19 (57.6)	
> 170	54 (41.9)	42 (43.6)	12 (36.4)	
Unknown	5 (3.9)	3 (3.1)	2 (6.1)	
Median (range)	159.5 (10, 605)	160 (10, 605)	159 (52.0, 373.0)	

Table 1. (continued)

Characteristic	All patients	Δ Np73/TAp73 ratio		P
		Low expression	High expression	
Albumin, no. (%), g/dL				.39
≤ 3.5	19 (14.7)	12 (12.5)	7 (21.2)	
> 3.5	81 (62.8)	61 (63.5)	20 (60.6)	
Unknown	29 (22.5)	23 (24)	6 (18.2)	
Median (range)	4 (2.2, 5.4)	4.1 (2.2, 5.4)	3.9 (2.3, 5.2)	
Coagulopathy, no. (%)				.70
No	47 (36.4)	35 (36.5)	12 (36.4)	
Yes	80 (62)	59 (61.5)	21 (63.6)	
CR, %	85	89	76	.09
3-y OS, % (95% CI)	84 (77, 90)	91 (83, 95)	67 (48, 80)	.0005
3-y DFS, % (95% CI)	87 (78, 92)	95 (88, 98)	62 (39, 78)	<.0001
3-y CIR, % (95% CI)	9 (4, 16)	1.2 (0.1, 6)	30 (13, 49)	<.0001
3-y CI of NRM, % (95% CI)	4.6 (2, 10)	3.5 (1, 9)	8 (1.3, 23)	.36

CI, cumulative incidence; CIR, cumulative incidence of relapse; CR, complete remission; NRM, nonrelapse mortality.

Study design

Patients

A total of 129 consecutive patients with newly diagnosed APL, who were enrolled in the IC-APL study were included. Details about the diagnosis, classification, and treatment protocol are published elsewhere.⁸ According to the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all patients.

Gene expression profile of *TP73* isoforms

The transcript levels of *TP73* isoforms (Δ Np73 and TAp73) were quantified using the TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. Details can be found in supplemental Data (see supplemental Data available at the *Blood* Web site).

Statistical analysis

Patient baseline characteristics were reported descriptively. Using survival receiver operating characteristic curve analysis⁹ and the C index,¹⁰ we dichotomized patients into 2 groups according to Δ Np73/TAp73 ratio to low expression, < 1.6 ; high expression, ≥ 1.6 . All *P* values were 2-sided with a significance level of .05. Details of the statistical analysis and clinical end points can be found in supplemental Data.

Results and discussion

The Δ Np73/TAp73 ratio had a median value of 0.6 (range, 0-72.6) whereas the median values of the primary data from Δ Np73 and TAp73 were 11 (range, 0-3371) and 23.5 (range, 0-316), respectively. Supplemental Figure 1 shows the endogenous levels of Δ Np73 and TAp73 proteins in primary APL blasts. Baseline characteristics were similar between patients with low and high Δ Np73/TAp73 ratios (Table 1), except for higher white blood cell (WBC) counts in patients with high Δ Np73/TAp73 ratio (*P* = .0002). Considering Programa para el Tratamiento de Hemopatías

Malignas/Gruppo Italiano Malattie Ematologiche in Adulti criteria.¹¹ 24% and 67% of patients assigned to the low and high $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ groups were classified as having a high risk of relapse, respectively ($P < .0001$).

Of the 129 subjects included in the study, 3 patients were lost to follow-up prior to the assessment of remission status and thus were not counted in the induction outcome analysis. Overall, 110 of 126 patients (87%) achieved complete hematologic remission. Although patients with a high $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio had a lower complete remission rate (76%) compared with those with a low $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio (89%), this difference did not reach significance ($P = .09$). Of 16 patients (13%) who failed to achieve complete remission, 12 (9%) died within 30 days after diagnosis (early mortality). Patients with a high $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio had an almost fivefold higher risk of early mortality (odds ratio, 4.8; 95% confidence interval [CI], 1.52-15.1; $P = .008$).

The median follow-up was 33 months (range, 1-72 months), with estimated 3-year overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) of 84% (95% CI, 77%-90%) and 87% (95% CI, 78%-92%), respectively. Patients with a high $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio had a lower 3-year OS (67%; 95% CI, 48%-80%) compared with patients with a low $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio (91%; 95% CI, 83%-95%) ($P = .0005$) (Figure 1A). This result was consistent with the multivariable proportional hazards analysis (supplemental Table 2). Patients with a high $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio had significantly lower 3-year DFS (62%; 95% CI, 39%-78%) compared with patients with a low ratio (95%; 95% CI, 88%-98%) ($P < .0001$) (Figure 1B). In agreement, the 3-year CIR was higher in patients with a high ratio ($P < .0001$) (Figure 1C). The CINRM was similar between groups ($P = .36$; Figure 1C). Details for patient outcomes are summarized in Table 1.

It is important to highlight that prognostic factors that may predict inferior outcome in APL have been investigated widely. The most well-known risk factors are WBC and platelet counts at diagnosis,¹¹ although internal tandem duplications of the *FLT3* gene,¹² aberrant expression of the CD56 antigen,¹³ deregulated expression of the *MLL5* gene,¹⁴ and a polymorphic variant involving the promoter of the gene encoding the CD95 cell death receptor¹⁵ are potential predictors of poor prognosis in APL. Here, we provide the first evidence that higher $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio is associated with a lower remission rate, shorter survival, and higher risk of relapse in a relatively large series of patients with APL homogeneously treated with all-trans retinoic acid (ATRA) and anthracycline-based chemotherapy. Importantly, we may not rule out the potential prognostic impact of the imbalance between ΔNp73 and TAp73 transcripts in other acute myeloid leukemia subtypes nor the role of other AML-associated fusion proteins than the promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha in *TP73* gene expression.

Our findings are in accordance with previous studies, which also associated the ΔNp73 overexpression (alone or in association with TAp73 , ie, $\Delta\text{N}/\text{TA}$ ratio) with treatment outcome in primary human tumors.¹⁶⁻¹⁸ Of interest, several alternative splice variants at the C termini ($\alpha-0$) and N terminus ($p73\Delta\text{ex}2$, $p73\Delta\text{ex}2/3$, collectively called ΔTAp73) of *p73* have been described in human hematologic malignancies,^{19,20} and these isoforms may directly affect the $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio. Here, using specific probes for transcriptionally active (ie, TA) and inactive (ie, ΔN) isoforms, we evaluated the "pool" of TA and ΔNp73 transcripts, not distinguishing among the different C-termini or N-termini variants. At the protein level, multiple TAp73 isoforms were expressed in primary APL blasts, although no association between gene and protein expression has

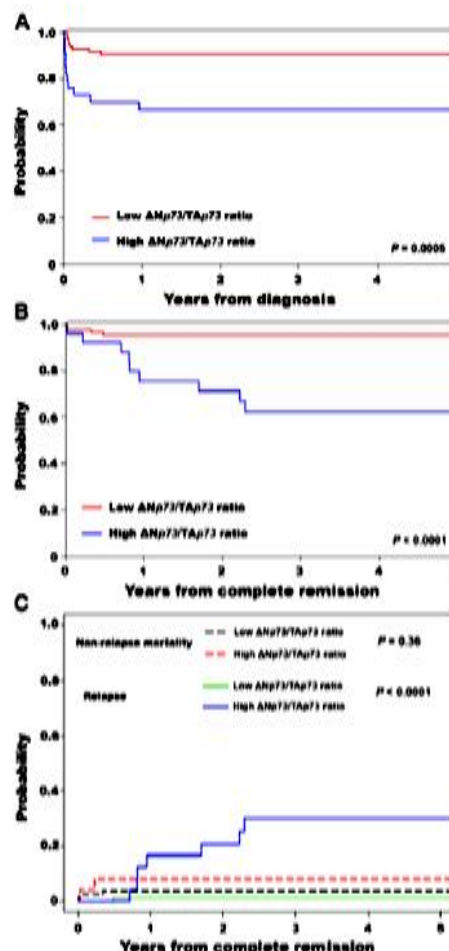


Figure 1. Survival results for patients with APL according to the $\Delta\text{Np73}/\text{TAp73}$ ratio. Probability of (A) OS, (B) DFS, and (C) cumulative incidence of relapse and nonrelapse mortality.

been demonstrated (supplemental Figure 1). This result must be regarded with caution because protein analysis was possible in only a few cases (6 patients). The underlying cause of the lack of association between messenger RNA and protein levels is not clear, but some evidences suggests that alternative pathways for selective degradation of *p73* isoforms might be involved. Sayan et al showed that the ring-finger protein (PIR2) is transcriptionally induced by TAp73 and specifically degrades ΔNp73 .²¹ In addition, Dulloo et al showed that the nonclassical polyamine-induced antizyme pathway degrades the ΔNp73 protein and stabilizes TAp73 .²² Under "stress" conditions, c-Jun induces antizyme expression, which then directly interacts with ΔNp73 to induce degradation. Importantly, the decision about which isoform

will be stabilized or degraded will depend on cell type and their environment, along with the need of the cell to make the decision to die or to repair the DNA damage.^{19,20,23,24}

Particularly in APL, *TP53* mutations are uncommon,²⁵ which further highlights the relevance of the Δ Np73/TAp73 ratio to both survival advantage and failure to respond to chemotherapy. It is important to note that an intricate functional relationship between *TP53* family members has been described²⁶ and, although speculative, it is conceivable that in patients with wild-type *TP53*, the overexpression of Δ Np73 protein would impair p53 tumor-suppressor functions. Thus, survival advantage would be the result of a high Δ Np73/TAp73 ratio, rather than *TP53* mutations. In line with this hypothesis, Concini et al showed that, in ovarian cancer patients, higher expression levels of Δ Np73 and Δ N⁷p73 isoforms were more frequently detected in *TP53* wild-type tumors than in *TP53* mutated ones.²⁷ Moreover, patients harboring *TP53* mutations and overexpressing Δ Np73 isoforms had a poorer response to chemotherapy.²⁷

Considering that the combination of ATRA and arsenic trioxide probably will become the new standard of care for APL,²⁸ it will be important to test the prognostic relevance of our findings in this context. It must be stressed that arsenic treatment is not available as first-line therapy in most countries in Latin America; therefore, we could not evaluate the impact of Δ Np73/TAp73 ratio in arsenic-treated patients. Future studies of the functional role of Δ Np73 could provide insight that might be useful in establishing new strategies and more effective therapies in APL, including the importance of APL treatment based on ATRA in combination with arsenic trioxide.²⁸

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge all members of the International Consortium on Acute Leukemia of the American Society of Hematology.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant #2013/08135-2) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ; grant #573754/2008-0). A.R.L.-A. received a fellowship from FAPESP (grant #2007/55067-1).

Authorship

Contribution: A.R.L.-A. performed experiments, analyzed and interpreted data, and drafted the article; H.T.K. performed the statistical analyses and reviewed the paper; C.T. and J.L.C.-S. performed experiments, collected data, and reviewed the paper; R.H.J., R.A.M., R. Bittencourt, R.P., K.P., A.B.F.G., M.d.L.C., M.A., C.S.C., I.M., R. Bendlin, C.S., and C.B. provided the samples, updated the clinical data, and reviewed the paper; and S.L.S., M.S.T., D.G., A.G., N.B., R.C.R., F.L.-C., B.L., M.A.S., and E.M.R. designed the treatment protocol, reviewed the paper, and gave final approval of the submitted version.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Eduardo M. Rego, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14048-900, Brazil; e-mail: edumrego@hotmail.com.

References

- Grob TJ, Novak U, Maisee C, et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*. 2001; 8(12):1213-1223.
- Joet CA, Marin MC, Kaelin WG Jr. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. 1997;389(6647):191-194.
- Ishimoto O, Kawahara C, Erjo K, Oginata M, Nukawa T, Iwawa S. Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res*. 2002;62(3):630-641.
- Pozniak CD, Radnovic S, Yang A, McKeon F, Kaptein DR, Miller FD. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*. 2000; 288(5477):304-306.
- Buhlmann S, Pütz BM. Dnp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1785(2):207-216.
- Meier M, den Boer ML, Meijerink JP, et al. Differential expression of p73 isoforms in relation to drug resistance in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2006;20(8):1377-1384.
- Lucena-Araujo AR, Panepucci RA, dos Santos GA, et al. The expression of DeltaNTP73, TATP73 and TP53 genes in acute myeloid leukaemia is associated with recurrent cytogenetic abnormalities and in vitro susceptibility to cytarabine cytotoxicity. *Br J Haematol*. 2008;142(1):74-78.
- Rego EM, Kim HT, Ruiz-Argüelles GJ, et al. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. *Blood*. 2013;121(11):1935-1943.
- Heagerty PJ, Zheng Y. Survival model predictive accuracy and ROC curves. *Biometrics*. 2005; 61(1):92-105.
- Harrell FE Jr, Califf RM, Pryor DB, Lee KL, Rosati RA. Evaluating the yield of medical tests. *JAMA*. 1992;267(18):2543-2546.
- Sanz MA, Lo Coco F, Marin G, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*. 2000;96(4):1247-1253.
- Lucena-Araujo AR, Kim HT, Jacomo RH, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene confers poor overall survival in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia study. *Ann Hematol*. 2014; 93(12):2001-2010.
- Montesinos P, Rayón C, Velasco E, et al. PETHEMA; HOVON Groups. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based regimens. *Blood*. 2011;117(6):1799-1805.
- Lucena-Araujo AR, Kim HT, Jacomo RH, et al. Prognostic impact of KMT2E transcript levels on outcome of patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia study. *Br J Haematol*. 2014;166(4):540-549.
- Sunter NJ, Scott K, Hills R, et al. A functional variant in the core promoter of the CD95 cell death receptor gene predicts prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(1):196-205.
- Dominguez G, García JM, Peña C, et al. DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J Clin Oncol*. 2006;24(5):806-815.
- Leung TH, Wong SC, Chan KK, Chen DW, Cheung AN, Ngan HY. The interaction between C35 and Δ Np73 promotes chemo-resistance in ovarian cancer cells. *Br J Cancer*. 2013;109(4):965-975.
- Soldevilla B, Diaz R, Silva J, et al. Prognostic impact of Δ TAp73 isoform levels and their target genes in colon cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2011;17(18):6029-6039.
- Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, et al. Negative autoregulation of p73 and p53 by DeltaNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett*. 2003;197(1-2):105-109.
- Slade N, Zaika AI, Erster S, Moll UM. DeltaNp73 stabilizes TAp73 proteins but compromises their function due to inhibitory hetero-oligomer formation. *Cell Death Differ*. 2004;11(3):357-360.
- Sayan BS, Yang AL, Contorni F, et al. Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(29):12877-12882.
- Dulloo L, Gopalan G, Melino G, Sabapathy K. The antiapoptotic DeltaNp73 is degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the autophagy-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(11):4902-4907.

8. Anexo E

Artigo 2: Autoria

Periódico ***British Journal of Haematology***: IF4,711

Qualis Capes Ciências Biológicas 1-A1

Prognostic importance of CD56 expression in intermediate risk acute myeloid leukemia

Juan L. Coelho-Silva, Luany E Carvalho, Mayara M Oliveira, Pedro L França-Neto, Adryanna T Andrade, Aleide S Melo, Matheus F Bezerra, Maria A Neves, Júlia Fonseca, Maria C Barros-Correia, Cíntia G Machado, Marcos A Bezerra, Daniel M MatosAntonio R. Lucena-Araujo

Prognostic importance of CD56 expression in intermediate risk acute myeloid leukaemia

Recently, we showed that clinical outcomes of Brazilian acute myeloid leukaemia (AML) patients were significantly inferior to those in the USA and Europe. Excluding well-recognized differences between developed and developing countries, heterogeneity in outcome still exists in patients with the same cytogenetic risk (Lima *et al.* 2015). Therefore, it would be interesting to identify supplementary biological markers that yield non-redundant biological information for further prognostic refinement of AML patients. In this context, aberrant expression of CD56 antigen (also termed NCAM1) in leukaemic blasts has been frequently associated with inferior outcome in patients with AML, particularly those with t(8;21) (Iriyama *et al.* 2013) and t(15;17) abnormalities (Montesinos *et al.* 2011). Nevertheless, knowledge regarding its prognostic value in other subtypes of AML remains limited. Here, we evaluated clinical outcomes of non-selected patients with AML (non-acute promyelocytic leukaemia) according to CD56 expression. Our data suggest that aberrant expression of this antigen may predict inferior outcome in patients with intermediate outcome.

One hundred and forty-one newly diagnosed AML patients were included between August 2008 and April 2015, with last follow-up in May 2015. Patients were classified according to morphological, immunophenotypic and cytogenetic findings. Treatment protocol was previously described (Lima *et al.* 2015). The local Research Ethics Board approved the study. To determine CD56 antigen expression, immunophenotypic analysis was accomplished using diagnostic bone-marrow samples and standard flow-cytometry methods. Patients were designated 'CD56-positive' when $\geq 20\%$ of

leukaemic cells expressed CD56 antigen (Bene *et al.* 1995). Fisher's exact test or Chi-square test, as appropriate, was used to compare categorical variables. Wilcoxon rank-sum test was used to compare continuous variables. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) were calculated using the Kaplan-Meier method. OS was defined as the time from the initiation of induction therapy to death from any cause; those alive or lost to follow-up were censored at the date last known alive. DFS was defined as the time from complete remission to disease relapse, development of secondary malignancy, or death from any cause, whichever occurred first. Patients who were alive without disease relapse or secondary malignancy were censored at the time last seen alive and disease-free. The log-rank test was used for comparisons of Kaplan-Meier curves.

Univariate and multivariate proportional hazards regression analysis was performed for potential prognostic factors for OS and DFS (Table 1). Potential prognostic factors examined in multivariate regression analysis were CD56 expression, cytogenetic risk stratification, age at diagnosis and leucocyte counts. Proportional hazards assumption for each variable of interest was tested. Linearity assumption for all continuous variables was examined using restricted cubic spline estimates of the relationship between the continuous variable and log relative hazard/risk. All *P*-values were two sided with a significance level of 0.05. All calculations were performed using Stata Statistic/Data Analysis version 12 (Stata Corporation, College Station, TX, USA) and R 2.10.1 (The CRAN project, www.r-project.org) software.

Table 1. Univariate and multivariate analysis for overall survival and disease-free survival.

		Univariate analysis			Multivariate analysis				
End point	Model Variables	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value		
Overall survival	CD56 expression: positive versus negative	1.79	1.28	2.49	0.001	1.94	1.09	3.45	0.022
	Age (years): continuous variable	1.1	1.06	1.2	0.001	1.1	1.01	1.3	0.041
	Cytogenetic risk stratification: adverse versus intermediate vs favourable	1.47	1.27	2.33	0.003	1.19	0.73	1.93	0.48
	Leucocyte counts ($\times 10^9/l$): continuous variable	1.03	1.01	1.05	0.014	1.02	0.99	1.07	0.297
Disease-free survival	CD56 expression: positive versus negative	4.49	1.93	10.5	<0.001	6.35	1.85	21.7	0.003
	Age (years): continuous variable	0.99	0.97	1.02	0.797	0.99	0.97	1.02	0.96
	Cytogenetic risk stratification: adverse versus intermediate versus favourable	1.64	0.57	4.69	0.354	3.52	1.12	11.1	0.031
	Leucocyte counts ($\times 10^9/l$): continuous variable	1.08	1.03	1.14	0.001	0.99	0.98	1.09	0.581

Hazard ratios (HR) >1 or <1 indicate an increased or decreased risk, respectively, of an event for the first category listed.

Correspondence

Patient baseline characteristics were reported descriptively. The median age was 49 years (range: 18–84 years) with 64 males (45%). Thirty-nine patients (28%) were ≥ 60 years. Pre-treatment bone marrow samples were analysed by G-banding cytogenetics, of which 105 (75%) were successful. Patients were stratified according to Grimwade *et al* (2010) as follows: favourable (28/105; 27%), intermediate (64/105; 61%) and adverse (13/105; 12%); 50 patients (48%) were cytogenetically normal. CD56 analysis was accomplished in 127/141 patients (90%). The remaining 14 patients (10%) had no CD56 data or samples available for further characterization, and were excluded from analysis. To test whether the samples without CD56 results were missing at random, the OS was evaluated for patients with and without CD56 data.

Five-year OS rate did not differ between patients with (35%) and without (25%) available CD56 data ($P = 0.96$). Aberrant CD56 expression was identified in 33 patients (26%). There were no significant differences among CD56-negative and CD56-positive patients with respect to baseline characteristics. The frequencies of CD56 expression in favourable, intermediate and adverse groups were 31%, 22%, and 55%, respectively ($P = 0.102$).

Three of the 141 included patients were lost to follow-up prior to the assessment of remission status and were excluded from subsequent analyses. Overall, 72/138 patients (52%) achieved complete remission (CR), CD56 expression was not associated with CR achievement ($P = 0.424$). The median follow-up was 208 d (95% confidence interval [CI]:

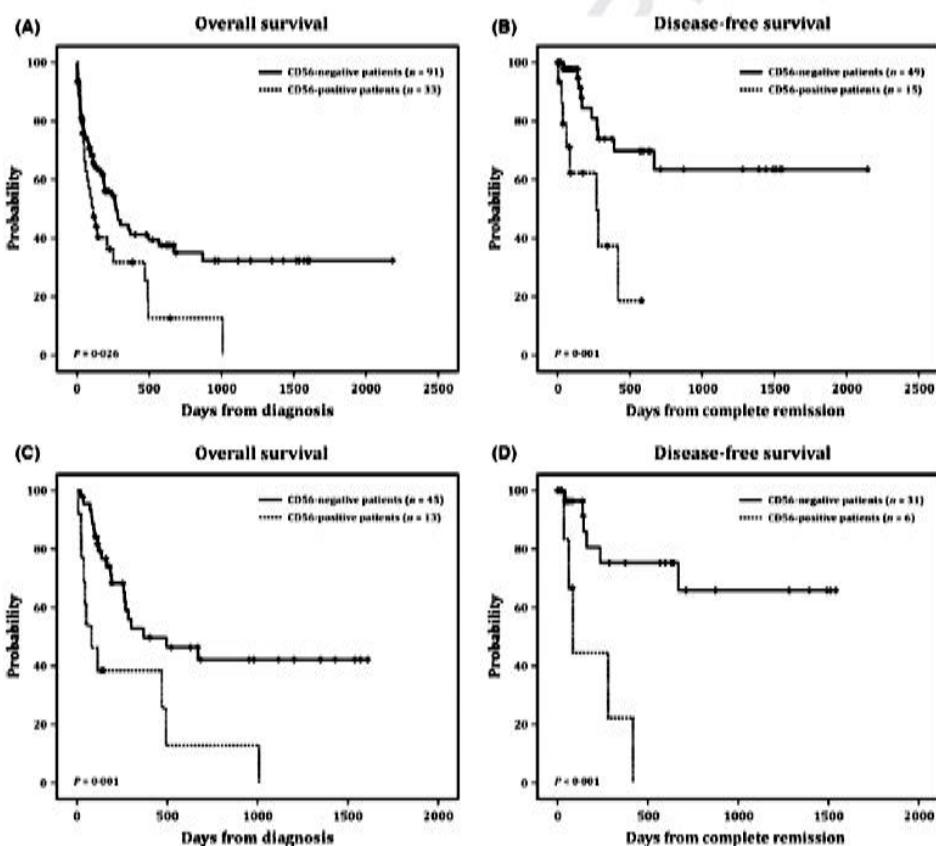


Fig 1. Patient survival. Probability of overall survival (A) and disease-free survival (B) in acute myeloid leukaemia patients according to CD56 expression (entire cohort). Overall survival (C) and disease-free survival (D) in patients with intermediate outcome according to CD56 expression. Overall survival and disease-free survival were estimated using the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used for comparison of the survival curves. n, the number of patients included in each analysis.

106–309 d). CD56-positive patients exhibited significantly shorter survival (114 d, 95%CI: 48–179 d) than CD56-negative patients (270 d, 95%CI: 161–378 d) ($P = 0.026$; Fig 1A). The median DFS for CD56-positive and CD56-negative groups was 269 d (95%CI: 28–509 d), and 1467 d (95%CI: 1120–1815 d), respectively ($P = 0.001$; Fig 1B). In multivariate proportional hazards regression analysis, CD56 expression was independently associated with shorter OS (hazard ratio [HR]: 1.94, 95%CI: 1.09–3.45; $P = 0.022$) and shorter DFS (HR: 6.35, 95%CI: 1.85–21.7; $P = 0.003$), considering cytogenetic risk stratification, leucocyte counts and age at diagnosis as confounders. Next, we analysed the impact of CD56 expression in each cytogenetic risk group. For patients assigned to the favourable group, CD56 expression had no impact on CR ($P = 0.202$), OS ($P = 0.161$) or DFS ($P = 0.642$). Similar results were observed in the adverse group (CR, $P = 0.635$; OS, $P = 0.14$; DFS, $P = 0.317$). In contrast, aberrant expression of CD56 identified patients assigned to the intermediate group with shorter OS ($P = 0.001$; Fig 1C) and DFS ($P < 0.001$; Fig 1D), but had no impact on CR ($P = 0.191$). These results were consistent with the multivariate analysis (OS, HR: 3.19, 95%CI: 1.49–6.84; $P = 0.003$; DFS, HR: 7.79, 95%CI: 1.8–33.6; $P = 0.006$).

We and others (Raspadori *et al.*, 2001; Alegretti *et al.*, 2011; Djunic *et al.*, 2012) have demonstrated that aberrant expression of CD56 antigen is associated with inferior outcome in AML. Of interest, some evidence suggests that CD56-positive blasts may emerge from less-differentiated leukaemic stem cells (Montesinos *et al.*, 2011) and are less sensitive to standard chemotherapy schemes (Chapiro *et al.*, 2006). Furthermore, co-expression with multidrug resistance (Raspadori *et al.*, 2001) and extramedullary infiltrates (Chang *et al.*, 2004) are frequent findings in CD56-positive patient-sand may underlie the adverse outcomes predicted by CD56 antigen. To the best of our knowledge, our study represents the first to evaluate the prognostic impact of CD56 expression in a real-life setting and address these findings to a large and heterogeneous subset of AML, such as intermediate cytogenetic risk group. However, limitations of our study include limited number of patients and a relative short follow-up. These results need to be confirmed in an independent cohort. If confirmed, CD56 measurement may constitute a cheap and effective alternative for the management of AML patients in less privileged countries, where the global majority of AML patients will probably be treated and where access to molecular tests are still limited.

References

- Alegretti, A.P., Bittar, C.M., Bittencourt, R., Piccoli, A.K., Schneider, L., Silla, L.M., Bo, S.D. & Xavier, R.M. (2011) The expression of CD56 antigen is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, **33**, 202–206.
- Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A. & van't Veer, M.B. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, **9**, 1783–1786.
- Chang, H., Brandwein, J., Yi, Q.L., Chun, K., Patterson, B. & Brien, B. (2004) Extramedullary infiltrates of AML are associated with CD56 expression, 11q23 abnormalities and

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant #444656/2014-6).

Conflicts of Interest

The authors have no competing financial interests to declare.

Authorship Contributions

J.L.C.-S. collected, analysed and interpreted data and drafted the manuscript. A.R.L.-A performed the statistical analyses, interpreted data and drafted the manuscript. L.E.C., M.F.B., M.M.O., P.L.F.-N., M.A.N., M.C.B.-C., C.G.M. and D.M.M. obtained the samples, updated the clinical data and reviewed the manuscript. M.A.B., D.M.M. and A.R.L.-A reviewed the paper and gave final approval for the submitted version.

Juan L. Coelho-Silva¹

Luany E. Carvalho²

Mayara M. Oliveira¹

Pedro L. Franca-Neto¹

Adryanna T. Andrade¹

Aleide S. Lima¹

Mathheus F. Bezerra¹

Marinus M. Lima³

Maria A. Neves⁴

Julia M. Fonseca⁴

Maria C. Barros-Correia⁴

Cintia G. Machado⁴

Marcos A. Bezerra¹

Daniel M. Matos²

Antonio R. Lucena-Araujo¹

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, ²Division of Haematology, Centre of Haematology and Haemotherapy of Ceará, Fortaleza, ³Department of Internal Medicine, Cancer Hospital of Pernambuco, and ⁴Department of Internal Medicine, Haematology and Haemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil.
E-mail: araujoarl@hotmail.com

Keywords: Acute myeloid leukaemia, CD56 expression, prognostic factors, treatment outcome, developing countries

Correspondence

- inferior clinical outcome. *Leuk. Res.*, **28**, 1007–1011.
- Chapiro, E., Delabesse, E., Anafi, V., Millien, C., Davi, F., Nugent, E., Beldjord, K., Haeflrich, T., Grimwade, D. & Macintyre, E.A. (2006) Expression of T-lineage-affiliated transcripts and TCR rearrangements in acute promyelocytic leukemia: implications for the cellular target of t(15;17). *Blood*, **108**, 3484–3493.
- Djunic, I., Virijevic, M., Djurasinovic, V., Novkovic, A., Golovic, N., Kraguljac-Kurtovic, N., Vidovic, A., Suvajdzic-Vukovic, N. & Tomin, D. (2012) Prognostic significance of CD56 antigen expression in patients with acute myeloid leukemia. *Med. Oncol.*, **29**, 2077–2082.
- Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J. & Burnett, A.K. (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, **116**, 354–365.
- Iriyama, N., Hata, Y., Takeuchi, J., Ogawa, Y., Ohtake, S., Sakura, T., Mitani, K., Ishida, F., Takahashi, M., Maeda, T., Izumi, T., Sakamaki, H., Miyawaki, S., Honda, S., Miyazaki, Y., Taki, T., Taniwaki, M. & Naoe, T. (2013) CD56 expression is an independent prognostic factor for relapse in acute myeloid leukemia with t(8;21). *Leuk. Res.*, **37**, 1021–1026.
- Lima, A.S., de Mello, M.R., Fernandes, E., Bezerra, M.F., Oliveira, M.M., Duarte, B.K., de Assis, R.A., Souto, E.R., Ramos, C.F., Machado, C.G., Pagnano, K., Lucena-Araujo, A.R., Lora-and-Metze, I. & Bezerra, M.A. (2015) Clinical outcomes of patients with acute myeloid leukemia: evaluation of genetic and molecular findings in a real-life setting. *Blood*, **126**, 1863–1865.
- Montesinos, P., Rayon, C., Vellenga, E., Brunet, S., Gonzalez, J., Gonzalez, M., Holowiecka, A., Esteve, J., Bergua, J., Gonzalez, J.D., Rivas, C., Tormo, M., Rubio, V., Bueno, J., Manso, F., Milone, G., de la Serna, J., Perez, I., Perez-Encinas, M., Krsnik, L., Ribera, J.M., Escoda, L., Lowenberg, B. & Sanz, M.A. (2011) Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based regimens. *Blood*, **117**, 1799–1805.
- Raspadori, D., Damiani, D., Lenoci, M., Rondelli, D., Testoni, N., Nardi, G., Sestigiani, C., Mariotti, C., Birtolo, S., Tozzi, M. & Lauria, F. (2001) CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia*, **15**, 1161–1164.

9. Curriculum vitae

Juan Luiz Coelho da Silva

Dados pessoais

Nome Juan Luiz Coelho da Silva
Filiação Josemar Coelho da Silva e Lindomar Lopes da Silva
Nascimento 12/05/1990 - Paulista/PE - Brasil
Carteira de Identidade 6982350 SDS - PE - 01/12/2006
CPF 074.919.904-01

Formação acadêmica/titulação

- 2014 - 2016** Mestrado em Programa de Pós Graduação em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Impacto clínico e laboratorial de mutações no gene ASXL1 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas, Ano de obtenção: 2016
 Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo
 Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Palavras-chave: NMPC, Prognóstico, ASXL1
Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica, Hematologia
- 2009 - 2013** Graduação em Biomedicina.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Características Moleculares do Desenvolvimento de Úlceras de Membros Inferiores em Pacientes com Anemia Falciforme
 Orientador: Diego Arruda Falcão
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Formação complementar

- 2013** Extensão universitária em Hematologia Laboratorial. (Carga horária: 125h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Palavras-chave: Hematologia
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Hematologia Laboratorial. (Carga horária: 100h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Palavras-chave: Hematologia, Ensino
- 2012 - 2012** Extensão universitária em Hematologia Laboratorial. (Carga horária: 80h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2012 - 2012** Extensão universitária em Hematologia Laboratorial. (Carga horária: 90h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

- 1. Universidade de São Paulo - USP**
-

Vínculo institucional

2015 - 2015 Vínculo: Colaborador de pesquisa , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 40, Regime: Integral
 Outras informações:
 Estágio realizado no hospital das clínicas da faculdade de medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), realizado sob supervisão da Dr^a Fabíola Traina, com vistas a capacitação profissional nas áreas de citogenética humana, biologia celular e molecular.

2. Hospital das Clínicas de Pernambuco - HC-UFPE

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio Curricular , Carga horária: 30, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Estágio Curricular do Curso de Biomedicina.

3. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio Curricular , Carga horária: 25, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Estágio Curricular do Curso de Biomedicina.

4. Escola Politéc de Olinda - POLITEC

Vínculo institucional

2013 - 2014 Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor de Microbiologia , Carga horária: 4, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Professor da Disciplina de Microbiologia e Exames Bacteriológicos para o curso de Análises Clínicas.

2012 - 2014 Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor de Imunologia , Carga horária: 4, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Professor da disciplina de Imunologia e Sorologia para o curso de Análises Clínicas.

5. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Monitoria Exames Hematológicos , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 12, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Monitor para Graduação da Disciplina de Exames Hematológicos A para o curso de Biomedicina da UFPE.

2012 - 2013 Vínculo: Monitoria Exames Hematológicos , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 12, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Monitor para Graduação da Disciplina de Exames Hematológicos A para o curso de Biomedicina da UFPE.

2012 - 2012 Vínculo: Monitoria Exames Hematológicos , Enquadramento funcional: Voluntário , Carga horária: 12, Regime: Parcial
 Outras informações:

Monitor para Graduação da Disciplina de Exames Hematológicos A para o curso de Biomedicina da UFPE.

2011 - 2012 Vínculo: Monitoria Biofísica , Enquadramento funcional: Voluntário , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitor para Graduação da Disciplina de Biofísica 1 para os cursos de Ciências Biológicas, Odontologia, Farmácia e Biomedicina da UFPE.

Atividades

01/2013 - Atual Ensino médio
Especificação:
Microbiologia Clínica

08/2012 - Atual Ensino médio
Especificação:
Imunologia e Sorologia

Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa**2015 - Atual** INVESTIGAÇÃO DO STATUS MUTACIONAL E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DO ASXL1 EM PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS ã CROMOSSOMO Ph-NEGATIVO

Descrição: As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPCs) constituem um grupo de doenças hematopoéticas clonais caracterizadas pela produção excessiva de uma ou mais linhagens de células maduras do sangue periférico, levando a complicações clínicas como organomegalia, trombose, hemorragia e potencial evolução para mielofibrose e leucemia aguda. Estas condições estão associadas, em parte, à mutação somática de uma Janus quinase 2 (JAK2) que leva à troca de valina por fenilalanina na posição 617 da proteína (JAK2 V617F). Contudo, em cerca de 40-50% dos casos, esta mutação não se encontra presente, sugerindo que eventos adicionais possam exercer algum papel na fisiopatologia da doença. Neste contexto, o gene ASXL1, responsável por codificar uma metil-transferase capaz de exercer modificações pós-traducionais de proteínas grupo Polycomb e do complexo Trithorax, se destaca por estar frequentemente mutado em tumores humanos, incluindo neoplasias hematológicas. Apesar de mutações no ASXL1 terem sido associadas a um pior prognóstico em indivíduos com leucemias agudas, seu impacto nas NMPCs ainda não está completamente esclarecido. Desta forma, o presente projeto tem como principal objetivo caracterizar pacientes com NMPCs cromossomo Filadélfia (Ph) e JAK2 V617F negativas de acordo com status mutacional e níveis de expressão do gene ASXL1, e correlacionar esses achados com o desfecho clínico e com características clinico-laboratoriais desses pacientes.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (3);

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva (Responsável); ; Marcos André Cavalcanti Bezerra; Antonio Roberto Lucena-Araujo; Mayara Matias de Oliveira; Pedro Luiz de França Neto

Projeto de extensãoProjeto de extensão**2014 - 2014** II Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas

Descrição: Curso que visa a qualificação de estudantes a realização de punção venosa e técnicas hematológicas básicas.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra (Responsável); Matheus Filgueira Bezerra; Mariana Barros Souto de Souza; Igor de Farias Domingos; Antonio Roberto Lucena-Araujo; Luana Priscila Moraes Laranjeira; Rayssa Leal Borges de Medeiros; Mayara Matias de Oliveira; Ana Beatriz Albuquerque do Nascimento; Pedro Luiz de França Neto

2014 - 2014 I Curso de Imersão em Citologia Hematológica

Descrição: Curso que visa a contextualização e normatização de informações relativas ao hemograma e suas alterações.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva (Responsável); ; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra; Matheus Filgueira Bezerra; Diego Arruda Falcão; Mariana Barros Souto de Souza; Igor de Farias Domingos; Manuela Andrade Costa; Antonio Roberto Lucena-Araujo; Luana Priscila Moraes Laranjeira; Rayssa Leal Borges de Medeiros; Mayara Matias de Oliveira; Ana Beatriz Albuquerque do Nascimento; Pedro Luiz de França Neto

2014 - 2014 II Curso de Interpretação do Hemograma

Descrição: Curso que visa a contextualização e normatização de informações relativas ao hemograma e suas alterações.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva (Responsável); ; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra; Matheus Filgueira Bezerra; Diego Arruda Falcão; Mariana Barros Souto de Souza; Igor de Farias Domingos; Manuela Andrade Costa; Antonio Roberto Lucena-Araujo; Luana Priscila Moraes Laranjeira; Rayssa Leal Borges de Medeiros; Mayara Matias de Oliveira; Ana Beatriz Albuquerque do Nascimento

2014 - 2014 III Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas

Descrição: Curso que visa a qualificação de estudantes a realização de punção venosa e técnicas hematológicas básicas.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva (Responsável); ; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra; Matheus Filgueira Bezerra; Mariana Barros Souto de Souza; Igor de Farias Domingos; Manuela Andrade Costa; Antonio Roberto Lucena-Araujo; Luana Priscila Moraes Laranjeira; Rayssa Leal Borges de Medeiros; Mayara Matias de Oliveira; Ana Beatriz Albuquerque do Nascimento; Pedro Luiz de França Neto

2014 - 2014 V Curso de Hematologia Laboratorial

Descrição: Curso de Extensão que visa expor conhecimentos básicos e aplicados da hematologia laboratorial a profissionais e estudantes da área de saúde.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra (Responsável); Antonio Roberto Lucena-Araujo; Rayssa Leal Borges de Medeiros; Mayara Matias de Oliveira; Ana Beatriz Albuquerque do Nascimento; Pedro Luiz de França Neto

2014 - 2014 I Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas

Descrição: Curso que visa a qualificação de estudantes a realização de punção venosa e técnicas hematológicas básicas.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra (Responsável); Matheus Filgueira Bezerra; Mariana Barros Souto de Souza; Igor de Farias Domingos; Manuela Andrade Costa; Antonio Roberto Lucena-Araujo; Luana Priscila Moraes Laranjeira; Rayssa Leal Borges de Medeiros; Mayara Matias de Oliveira; Ana Beatriz Albuquerque do Nascimento; Pedro Luiz de França Neto

2013 - 2013 I Curso de Interpretação do Hemograma

Descrição: Curso que visa a contextualização e normatização de informações relativas ao hemograma e suas alterações.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva (Responsável); ; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra; Matheus Filgueira Bezerra; Diego Arruda Falcão; Mariana Barros Souto de Souza; Igor de Farias Domingos; Manuela Andrade Costa; Antonio Roberto Lucena-Araujo; Luana Priscila Moraes Laranjeira; Rayssa Leal Borges de Medeiros; Pedro Luiz de França Neto

2013 - 2013 IV Curso de Hematologia Laboratorial

Descrição: Quarto curso de extensão em Hematologia Laboratorial, cujo objetivo é a atualização profissional na área dos exames hematológicos.

Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (6); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra (Responsável); Andriu dos Santos Catena; Matheus Filgueira Bezerra; Adryanna Thaís Cavalcanti Andrade; Maria Amélia Carlos Souto Maior Borba; Pedro Luiz de França Neto

2013 - 2013 III Curso de Hematologia Laboratorial

Descrição: Terceiro curso de extensão em Hematologia Laboratorial, cujo objetivo é a atualização profissional na área dos exames hematológicos.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (6);

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva; Diego Antonio Pereira Martins; Marcos André Cavalcanti Bezerra (Responsável); Andriu dos Santos Catena; Kleyton Clementino da Silva; Matheus Filgueira Bezerra; Adryanna Thaís Cavalcanti Andrade

2012 - 2012 II Curso de Hematologia Laboratorial

Descrição: Segundo curso de Hematologia Laboratorial realizado no Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas-UFPE. O curso tem como principal objetivo a atualização de profissionais na área dos exames hematológicos.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (6);

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva; Diego Antonio Pereira Martins; Aíla Lima de Melo; Marcos André Cavalcanti Bezerra (Responsável); Andriu dos Santos Catena; Kleyton Clementino da Silva; Matheus Filgueira Bezerra

2012 - 2012 I Curso de Hematologia Laboratorial

Descrição: Primeiro curso de extensão em Hematologia Laboratorial, que tem como objetivo a atualização profissional na área dos exames hematológicos.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (6);

Integrantes: Juan Luiz Coelho da Silva; Diego Antonio Pereira Martins; Aíla Lima de Melo; Marcos André Cavalcanti Bezerra (Responsável); Andriu dos Santos Catena; Kleyton Clementino da Silva; Matheus Filgueira Bezerra

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Hematologia
3. Genética Humana e Médica

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Prêmios e títulos

2015 2º Melhor trabalho pela apresentação do trabalho "Impacto clínico e laboratorial de mutações no gene ASXL1 em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas" durante a V Jornada da PPGG, Programa de pós graduação em genética

2013 2º lugar pelo trabalho "TCF7L2 POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH FETAL GROWTH CHANGES: PRIMERS DESIGN", IV Simpósio Internacional em Diagnóstico e Terapêutica

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **COELHO-SILVA, JUAN L**; CARVALHO, LUANY E; OLIVEIRA, MAYARA M; FRANCA-NETO, PEDRO L; ANDRADE, ADRYANNA T; LIMA, ALEIDE S; BEZERRA, MATHEUS F; LIMA, MARINUS M; NEVES, MARIA A; FONSECA, JULIA M; BARROS-CORREIA, MARIA C; MACHADO, CINTIA G; BEZERRA, MARCOS A; MATOS, DANIEL M; LUCENA-ARAUJO, ANTONIO R

Prognostic importance of CD56 expression in intermediate risk acute myeloid leukaemia. British Journal of Haematology (Print). , v.N/A, p.n/a - n/a, 2016.

2. LUCENA-ARAUJO, A. R.; KIM, H. T.; THOME, C.; JACOMO, R. H.; MELO, R. A.; BITTENCOURT, R.; PASQUINI, R.; PAGNANO, K.; GLORIA, A. B. F.; CHAUFFAILLE, M. D. L.; ATHAYDE, M.; CHIATTONE, C. S.; MITO, I.; BENDLIN, R.; SOUZA, C.; BORTOLHEIRO, C.; **COELHO-SILVA, J. L.**; SCHRIER, S. L.; TALLMAN, M. S.; GRIMWADE, D.; GANSER, A.; BERLINER, N.; RIBEIRO, R. C.; LO-COCO, F.; LOWENBERG, B.; SANZ, M. A.; REGO, E. M.

High Np73/TAp73 ratio is associated with poor prognosis in acute promyelocytic leukemia. Blood (Philadelphia, PA). , v.126, p.2302 - 2306, 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **COELHO-SILVA, J. L.**; FRANCA-NETO, P. L.; ARAUJO, G. V. S.; COSTA, A. M.; MELO, G. D. L.; CUNHA, A. A.; BARROS-CORREIA, M. C.; BEZERRA, M. A. C.; LUCENA-ARAUJO, A. R.

Impacto clínico e laboratorial de mutações no gene ASXL1 em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2015, São Paulo.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2015.

2. BEZERA, M. F.; MELO, A. L. S.; **SILVA, J. L. C.**; M NETO, J.; FRANCA-NETO, P. L.; ROCHA, C. R. C.; MACHADO, C. G.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.; BELTRAO, E. I. C.

Associação entre polimorfismos no exon 4 do tp53 com aspectos clínico-laboratoriais de pacientes com leucemia mieloide aguda In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Elsevier, 2014. v.36.

3. Martins, D.A.P.; SOUZA, M. B. S.; DOMINGOS, I. F.; **SILVA, J. L. C.**; COSTA, M. A.; FRANCA-NETO, P. L.; GUEDES, G. M. R.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO ANXA2 (RS7170178) NA SUSCEPTIBILIDADE À OCORRÊNCIA DE OSTEONECROSE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Elsevier, 2014. v.36.

4. COSTA, M. A.; **SILVA, J. L. C.**; Martins, D.A.P.; FALCAO, D. A.; LARANJEIRA, L. P. M.; BELMONT, T. F. M.; CAVALCANTI, M. S. M.; ARAUJO, A. S.; BEZERRA, M. A. C.; LUCENA-ARAUJO, A. R.

INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO KLOTHO (RS685417) NA SUSCEPTIBILIDADE À OCORRÊNCIA DO PRIAPISMO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Elsevier, 2014. v.36.

5. COSTA, M. A.; **SILVA, J. L. C.**; Martins, D.A.P.; FALCAO, D. A.; LARANJEIRA, L. P. M.; BELMONT, T. F. M.; CAVALCANTI, M. S. M.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS TGFBR3 (RS2038931, RS7526590) NA SUSCEPTIBILIDADE À OCORRÊNCIA DO PRIAPISMO EM PACIENTES COM ANEMIA

FALCIFORME In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Elsevier, 2014. v.36.

6. ANDRADE, A. T. C.; BEZERA, M. F.; MELO, A. L. S.; FRANCA-NETO, P. L.; NEVES, M. A.; M NETO, J.; MACHADO, C. G.; BEZERRA, M. A. C.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; **SILVA, J. L. C.**

'PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CD56 ANTIGEN EXPRESSION ON TREATMENT OUTCOME OF PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKAEMIA In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Elsevier, 2014. v.36.

Apresentação de trabalho e palestra

1. COELHO-SILVA, J. L.

Identificação de marcadores prognósticos em Neoplasias Hematológicas, 2015. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

2. **COELHO-SILVA, J. L.**; FRANCA-NETO, P. L.; ARAUJO, G. V. S.; BEZERRA, M. A. C.; LUCENA-ARAUJO, A. R.

Impacto clínico e laboratorial de mutações no gene ASXL1 em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas, 2015. (Outra, Apresentação de Trabalho)

3. SILVA, J. L. C.

Hemoglobinopatias: práticas de detecção, 2013. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

4. **SILVA, J. L. C.**; CATENA, A. S.; Lima-Filho, J.L.; Martins, D.B.G.

Preliminary analyses of TLR9 (-1486 T/C) polymorphisms and its relationship with HPV infection, 2013. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

5. CATENA, A. S.; **SILVA, J. L. C.**; Lima-Filho, J.L.; Martins, D.B.G.

TCF7L2 polymorphisms associated with fetal growth changes: primers design, 2013. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

6. Ekert, M.H.F.; Melo, A.L.; **SILVA, J. L. C.**; Lima, H.Y.S; MEDEIROS, A. L. P.B.; ARAUJO, R. F. F.; Lima-Filho, J.L.; Martins, D.B.G.

Deletion in promoter region from Toll-Like Receptor 2 showed no association with susceptibility to human papillomavirus infection., 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

7. **SILVA, J. L. C.**; GALVAO, M. J. N.; CASTOR, M. G.; Lima-Filho, J.L.; Martins, D.B.G.

Polymorphism TLR2 (-196 to -174 del) is not associated to Human Papillomavirus Infection in Anal Samples, 2012. (Outra, Apresentação de Trabalho)

8. **SILVA, J. L. C.**; Melo, A.L.; Lima, H.Y.S; Martins, D.A.P.; Júnior, C.B.N.; Monteiro, B.G.Q.; Lima-Filho, J.L.; Martins, D.B.G.

Differential genotype for toll-like receptor 2 (-196 to -174 del) in blood and cervical samples of women attended in public health assistance., 2011. (Outra, Apresentação de Trabalho)

9. Vasconcelos, M.E.; **SILVA, J. L. C.**; Melo, A.L.; Ekert, M.H.F.; Martins, D.B.G.; Lima-Filho, J.L.

HPV infection in cervical samples is not related to genetic polymorphism of toll-like receptor 2 (-196 to -174 del), 2011. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Mariana Barros Souto de Souza. **Investigação da talassemia alfa e do polimorfismo no gene**

da anexina A2 no desenvolvimento de osteonecrose em pacientes com anemia falciforme.

2014. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Osteonecrose, Prognóstico

Áreas do conhecimento : Genética, Hematologia

2. Pedro Luiz de França Neto. **Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas: uma revisão de conceitos, conduta terapêutica e perspectivas.** 2014. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Palavras-chave: NMPC, Diagnóstico , Prognóstico

Áreas do conhecimento : Hematologia, Genética Humana e Médica

Setores de atividade : Atividades de atenção à saúde humana

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2015. (Congresso)

Impacto clínico e laboratorial de mutações no gene ASXL1 em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.

2. **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2014. (Congresso)

.

3. **XIV Curso de Verão: Genoma, Proteoma e Universo Celular**, 2014. (Outra)

Aplicações da citometria de fluxo em pesquisa biomédica.

4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XI Reunião Regional Nordeste da SBBq, 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology**, 2012. (Encontro)

Polymorphism in TLR2 Gene (-196 to -174 del) is not Associated to Human Papillomavirus Infection Susceptibility in Colorectal Cancer Samples.

5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **III Simpósio Internacional em Diagnóstico e Terapêutica**, 2011. (Simpósio)

DIFFERENTIAL GENOTYPE FOR TOLL-LIKE RECEPTOR 2 (-196 TO -174 del) IN BLOOD AND CERVICAL SAMPLES OF WOMEN ATTENDED IN PUBLIC HEALTH ASSISTANCE.

6. **1st. Brazilian-German meeting of Plant Systems Biology and Bioenergy**, 2010. (Encontro)

.

7. **VII Congresso da Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares**, 2010. (Congresso)

.

8. **XII Congresso Brasileiro de Biomedicina**, 2010. (Congresso)

.

Organização de evento

1. ANDRADE, A. T. C.; Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; BEZERRA, M. A. C.; BEZERRA, M. F.; FRANCA-NETO, P. L.; SOUZA, M. B. S.; DOMINGOS, I. F.; COSTA, M. A.; LARANJEIRA, L. P. M.; MEDEIROS, R. L. B.; OLIVEIRA, M. M.; NASCIMENTO, A. B. A.

I Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas, 2014. (Outro, Organização de evento)

2. Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; BEZERRA, M. A. C.; FRANCA-NETO, P. L.; OLIVEIRA, M. M.; NASCIMENTO, A. B. A.

I Curso de Imersão em Citologia Hematológica, 2014. (Outro, Organização de evento)

3. Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; BEZERRA, M. A. C.; BEZERRA, M. F.; FRANCA-NETO, P. L.; FALCAO, D. A.; SOUZA, M. B. S.; DOMINGOS, I. F.; COSTA, M. A.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; LARANJEIRA, L. P. M.; MEDEIROS, R. L. B.

I Curso de Interpretação do Hemograma, 2014. (Outro, Organização de evento)

4. Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; BEZERRA, M. A. C.; BEZERA, M. F.; FRANCA-NETO, P. L.; SOUZA, M. B. S.; DOMINGOS, I. F.; COSTA, M. A.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; LARANJEIRA, L. P. M.; MEDEIROS, R. L. B.; OLIVEIRA, M. M.; NASCIMENTO, A. B. A.

II Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas, 2014. (Outro, Organização de evento)

5. Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; BEZERRA, M. A. C.; BEZERA, M. F.; FALCAO, D. A.; SOUZA, M. B. S.; DOMINGOS, I. F.; COSTA, M. A.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; LARANJEIRA, L. P. M.; FRANCA-NETO, P. L.; MEDEIROS, R. L. B.; OLIVEIRA, M. M.; NASCIMENTO, A. B. A.

II Curso de Interpretação do Hemograma, 2014. (Outro, Organização de evento)

6. Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; BEZERRA, M. A. C.; BEZERA, M. F.; FRANCA-NETO, P. L.; SOUZA, M. B. S.; DOMINGOS, I. F.; COSTA, M. A.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; LARANJEIRA, L. P. M.; MEDEIROS, R. L. B.; OLIVEIRA, M. M.; NASCIMENTO, A. B. A.

III Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas, 2014. (Outro, Organização de evento)

7. ANDRADE, A. T. C.; CATENA, A. S.; Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; BEZERRA, M. A. C.; SOUZA, M. B. S.; COSTA, M. A.; FRANCA-NETO, P. L.

IV Curso de Hematologia Laboratorial, 2014. (Outro, Organização de evento)

8. Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; BEZERRA, M. A. C.; FRANCA-NETO, P. L.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; MEDEIROS, R. L. B.; OLIVEIRA, M. M.; NASCIMENTO, A. B. A.

V Curso de Hematologia Laboratorial, 2014. (Outro, Organização de evento)

9. ANDRADE, A. T. C.; CATENA, A. S.; Martins, D.A.P.; **SILVA, J. L. C.**; SILVA, K. C.; BEZERRA, M. A. C.; BEZERA, M. F.

III Curso de Hematologia Laboratorial, 2013. (Outro, Organização de evento)

10. **SILVA, J. L. C.**; Martins, D.A.P.; Melo, A.L.; SILVA, K. C.; BEZERRA, M. A. C.; CATENA, A. S.; BEZERA, M. F.

I Curso de Extensão em Hematologia Laboratoria, 2012. (Outro, Organização de evento)

11. **SILVA, J. L. C.**; Melo, A.L.; Martins, D.A.P.; CATENA, A. S.; SILVA, K. C.; BEZERRA, M. F.; BEZERRA, M. A. C.

II Curso de Extensão em Hematologia Laboratorial, 2012. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. GUEDES, G. M. R.; FALCAO, D. A.; **SILVA, J. L. C.**

Participação em banca de Rayssa Leal Borges de Medeiros. **Avaliação de polimorfismo em genes inflamatórios nas alterações cerebrovasculares de pacientes com anemia falciforme, 2014**

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Prognóstico

Áreas do conhecimento : Genética, Hematologia

2. GUEDES, G. M. R.; **SILVA, J. L. C.**; MARTINS, D. A. P.

Participação em banca de Manuela Andrade Costa. **Investigação dos polimorfismos no gene TGFBR3 (rs2038931, rs 7526590) na susceptibilidade à ocorrência do priapismo em pacientes com anemia falciforme, 2014**

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Áreas do conhecimento : Genética, Hematologia

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	2
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	6
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	2
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	1
Apresentações de trabalhos (Simpósio).....	2
Apresentações de trabalhos (Outra).....	4

Orientações

Orientação concluída (trabalho de conclusão de curso de graduação).....	2
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	4
Participações em eventos (simpósio).....	1
Participações em eventos (encontro).....	2
Participações em eventos (outra).....	1
Organização de evento (outro).....	11
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	2