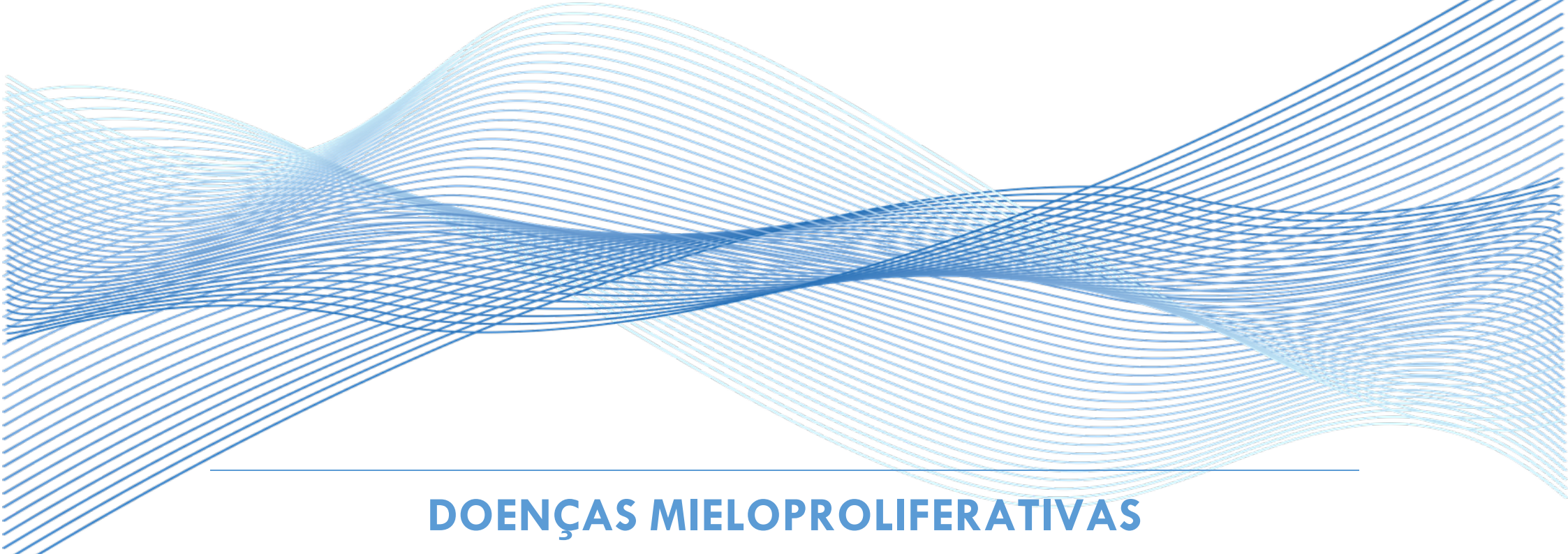




DOENÇAS MIELOPROLIFERATIVAS

PAPEL DAS MUTAÇÕES NO DIAGNÓSTICO

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR – ABHH

*Bendit I, Pagnano KBB, Santos FPS, Chauffaille MLLF, Mello MCR, Clementino NCD, Funke VAM, Fogliatto LM,
Tavares RS, Bernardo WM, Simoes RS, Kelmann G, Bernardo WM, Nonino A*

Elaboração: 10 de maio de 2018.

AS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS SÃO NEOPLASIAS CLONAIS DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ONDE SE VERIFICA PROLIFERAÇÃO EXACERBADA DE UMA OU MAIS SÉRIES MIELOIDES O QUE LEVA À LEUCOCITOSE NO SANGUE PERIFÉRICO, AUMENTO DA MASSA ERITROCITÁRIA OU À TROMBOCITOSE. O OBJETIVO DESTA DIRETRIZ É AVALIAR O PAPEL DAS MUTAÇÕES NO DIAGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA, POLICITEMIA VERA E TROMBOCITEMIA ESSENCIAL. UTILIZAMOS A FORMA ESTRUTURADA DE FORMULAR A PERGUNTA SINTETIZADA PELO ACRÔNIMO P.I.C.O., ONDE O P CORRESPONDE AOS PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS, I COMO INDICADOR MUTAÇÕES E O DE DESFECHOS DIAGNÓSTICO. FEITA SEM RESTRIÇÃO DE PERÍODO, NA BASE DE DADOS MEDLINE, 31 ESTUDOS FORAM SELECIONADOS PARA RESPONDER À DÚVIDA CLÍNICA. OS DETALHES DA METODOLOGIA E DOS RESULTADOS DESSA DIRETRIZ ESTÃO EXPOSTOS NO ANEXO I.

INTRODUÇÃO

As **neoplasias mieloproliferativas – NMPs** são neoplasias clonais de células-tronco hematopoiéticas onde se verifica proliferação exacerbada de uma ou mais séries mieloides o que leva à leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocitária ou à trombocitose. São doenças que apresentam manifestações clínicas heterogêneas, onde a progressão é caracterizada por fibrose medular ou transformação leucêmica. A mutação no gene da tirosina-quinase Janus kinase 2 (JAK2) tem se apresentado como marcador molecular de maior importância para o diagnóstico das NMPs, tendo sido incorporada, em 2008 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como critério maior no diagnóstico dessas doenças^{1,3}. A mutação somática JAK2 V617F é mutação pontual caracterizada pela troca de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 1849 do cDNA no éxon 14 do gene, que resulta em proteína citoplasmática constitutivamente ativa que promove ativação de várias moléculas e vias de sinalização, como a JAK/STAT, PI3K/AKT e RAS/MAPK, todas envolvidas na transformação e proliferação dos progenitores hematopoiéticos^{1,2}.

RESULTADOS

Análise citogenética foi conduzida de material extraído de leucócitos de sangue periférico ou de biopsias de medula óssea de 140 amostras clínicas oriundas de 130 pacientes com diagnóstico de doenças hematológicas (n=80 com neoplasias mieloproliferativas – NMPs e n=50 com doenças hematológicas não relacionadas às NMPs além de 10 pacientes sem doença). Todas as 140 amostras foram analisadas para a presença da mutação no gene JAK2. Dentre estas, 74 testaram positivas para mutação nos éxons 14 (n=36 com NMPS, n=31 com doenças hematológicas não relacionadas às NMPs e sete sem doença). A frequência de mutações identificadas em todas as amostras foi de 41,5%, sendo todas heterozigotas. Não foram verificadas mutações no gene JAK2 entre pacientes do grupo controle. A mutação V617F foi verificada em 82,1% dos pacientes com diagnóstico de policitemia vera (23/28); 53,1% em pacientes com trombocitemia essencial (17/32) e em 40% dos indivíduos com mielofibrose primária (4/10). De maneira geral, a taxa de mutação no gene JAK2 em pacientes com diagnóstico de neoplasia mieloproliferativa foi de 62,5% (50/80). Para doenças hematológicas não relacionadas às NMPs, quatro mutações V617F no gene JAK2 foram verificadas, sendo que nenhuma mutação JAK2 V617F foi verificada em pacientes do grupo controle⁴(B).

Um total de 168 pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas (114 com diagnóstico de trombocitemia essencial, n=36 com policitemia vera e n=18 com mielofibrose primária) foram incluídos na análise. A mutação no gene da calreticulina (CALR) foi detectada em 16,7% de todos os pacientes com NMPs, sendo que aproximadamente 22% dos pacientes com

diagnóstico de trombocitemia essencial e 16,7% daqueles com diagnóstico de mielofibrose primária apresentaram esta mutação. Mutação no gene JAK2 foi verificada em 86,1% dos pacientes com policitemia vera; 59,6% com diagnóstico de trombocitemia essencial e 50% dos pacientes com mielofibrose primária. Mutações no éxon 12 no gene JAK2 não foram verificadas. Mutações no gene MPL foram identificadas somente em pacientes com trombocitemia essencial (5/114). Para pacientes que não apresentavam mutações nos genes JAK2 e MPL, 58,5% (24/41) e 33,3% (3/9) com diagnóstico de trombocitemia essencial e mielofibrose primária respectivamente, mostraram-se positivos para mutação no gene da calreticulina. A incidência de triplo negativo (JAK2, MPL e calreticulina negativos) foi de 13,9%; 14% e 33,3% para policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária respectivamente⁵(B).

Quarenta e oito pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial e 14 com mielofibrose primária foram analisados a fim de avaliar incidência, características clínicas e impacto da mutação do gene da calreticulina. A mutação do gene CALR foi detectada em 24,2% dos pacientes, sendo que a incidência foi maior (50%) entre pacientes negativos para a mutação no gene da JAK2 (51,6% dos pacientes apresentavam a mutação V617F no gene JAK2). Indivíduos com diagnóstico de trombocitemia essencial portadores da mutação no gene da calreticulina eram mais jovens, apresentavam menor contagem de leucócitos e experimentaram menor número de eventos tromboembólicos em comparação aos pacientes que testaram positivos apenas para mutação no gene JAK2. Em pacientes negativos para mutação JAK2, a presença da mutação CALR não modificou a manifestação clínica, prognóstico e escore DIPSS⁶(B).

Vinte pacientes com diagnóstico de policitemia vera, 17 com trombocitemia essencial e 21 com mielofibrose primária foram analisados quanto a mutação no gene da JAK2 e MPL. A mutação V617F no gene da JAK2 foi observada em 90% dos pacientes com diagnóstico de policitemia vera, 42,8% dos pacientes com mielofibrose primária e em 47% daqueles com diagnóstico de trombocitemia essencial. Pacientes com policitemia vera negativos para a mutação JAK2 V617F apresentaram menor número de plaquetas e leucócitos em comparação àqueles positivos para esta mutação. Pacientes com mielofibrose primária positivos para as mutações JAK2 V617F e MPL W515L apresentaram maior grau de fibrose em medula óssea em comparação àqueles negativos para a mutação V617F JAK2. A mutação MPL W515L foi detectada em um paciente com mielofibrose primária e outro com trombocitemia essencial⁷(B).

Características clínicas e laboratoriais foram analisadas em pacientes com e sem a mutação V617F JAK2. A mutação V617F JAK2 foi verificada em 95%, 68% e 77% dos pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária respectivamente. Dentre todos os pacientes com NMPs, 19% apresentaram eventos trombóticos sendo observado que todos os pacientes com diagnóstico de policitemia vera com trombose eram positivos para a mutação JAK2 e 76,1% com trombocitemia essencial também positivos para esta mutação, apresentaram eventos tromboembólicos⁸(B).

Informações a respeito da análise citogenética de 184 pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas cromossomo Philadelphia negativas (107 com diagnóstico de trombocitemia essencial e 77 com mielofibrose primária) foram analisadas. A prevalência da mutação JAK2 V617F foi significativamente maior entre pacientes com diagnóstico de mielofibrose primária (75,3% *versus* 59,8% para pacientes com trombocitemia essencial). Quatorze de 77 pacientes com mielofibrose primária (18,2%) apresentavam simultaneamente mutações JAK2 V617F e ASXL1. Dentre os pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial, apenas 8,4% apresentavam a mutação ASXL1, sendo que aproximadamente 66,6% destes apresentavam a mutação JAK2 V617F. Em pacientes com mielofibrose primária, a presença da mutação JAK2 V617F não demonstrou diferença em termos de sobrevida global. Análise multivariada confirmou a relevância prognóstica independente da mutação ASXL1 sobre a sobrevida global nos pacientes com diagnóstico de mielofibrose primária (OR=2,75 com IC95%: 1,3 a 5,5)⁹(B).

Informações a respeito de 101 pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial foram analisadas a fim de avaliar o impacto das mutações nos genes JAK2, MPL e CALR sobre ocorrência de eventos tromboembólicos. A incidência de eventos tromboembólicos maiores relatados foi de 13,8%. Sessenta por cento dos pacientes apresentavam a mutação V617F JAK2 e 3,9% a mutação MPL W515L. A mutação do tipo 2 do gene da calreticulina foi verificada em apenas três casos que não apresentavam mutação JAK2 V617F. Não foi verificada associação entre mutação no gene da JAK2 e eventos tromboembólicos (RR=1,3 com IC95%: 0,4 a 4,2 e p=0,668)¹⁰(B).

RECOMENDAÇÃO:

Todos os pacientes com suspeita de NMPs devem ser avaliados para presença de mutações de genes ativadores da via JAK-STAT: JAK2, CALR e MPL. Mutações nestes 3 genes apresentam alta sensibilidade e moderada especificidade para diagnóstico de PV, TE e MF, devendo ser analisada em conjunto com outros critérios diagnósticos clínicos e laboratoriais para que possa ser estabelecido o diagnóstico correto do paciente. Devido a baixa prevalência de mutações do exon 12 do gene JAK2, a sua pesquisa deve ser realizada apenas em pacientes com suspeita clínica de PV que apresentem mutação do JAK2 V617F negativa e tenham baixo nível sérico de eritropoietina. Nos indivíduos com diagnóstico de TE ou MF que testaram negativos para a mutação JAK2 V617F, devem ser pesquisadas mutações do gene CALR,. Mutações em outros genes alterados recorrentemente em pacientes com neoplasias mielóides podem auxiliar no estabelecimento de um processo de clonalidade de um caso com suspeita de NMP, porém não necessitam serem realizadas rotineiramente para avaliação diagnóstica dado a sua baixa sensibilidade e especificidade, estando reservadas para aqueles casos negativos para as mutações do JAK2 V617F, CALR e MPL W515 e que apresentem quadro clínico e laboratorial sugestivo de síndromes mieloproliferativas.

DISCUSSÃO

A **mutação JAK2 V617F** é frequentemente identificada entre pacientes portadores de neoplasia mieloproliferativa, principalmente pacientes com PV (90%), seguido de pacientes com MF e TE (50-60%). Ela não é específica para nenhuma NMP, podendo ser também raramente encontrada em outras doenças hematológicas não relacionadas às NMPs tais como anemia refratária com sideroblastos em anel, leucemia mieloide aguda e mastocitose sistêmica. Portanto, a sua ausência ou presença, não exclui o diagnóstico ¹¹(B). Além da mutação V617F no gene JAK2, mutações em outros genes que levam à ativação da via JAK-STAT (ex.: CALR, MPL) também tem papel importante na patogênese, diagnóstico e prognóstico destas doenças.

A policitemia vera quase que invariavelmente (em aproximadamente 90% dos casos) encontra-se associada às mutações no gene JAK2 (mutação V617F e em menor frequência mutações no éxon 12), enquanto que somente 50% a 60% dos pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose primária apresentam a mutação V617F ²(B) ¹²(D). Importante mencionar que a mutação JAK2 V617F muitas vezes apresenta-se com carga alélica baixa¹³(B) (PMID), e que técnicas com maior sensibilidade para detecção da mutação devem ser empregadas. Isso justifica uma menor prevalência da mutação em estudos mais antigos realizados. Por exemplo, em dois estudos publicados em 2005 que descreveram a mutação JAK2 V617F em pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose, a prevalência da mutação era em torno de 70-80% em pacientes

com PV e 30-40% dos pacientes com trombocitemia e mielofibrose^{12,14}(**D**). Hoje sabe-se que a frequência desta mutação nestas doenças é bem mais elevada. Em um estudo de coorte prospectivo de 338 pacientes com PV publicado em 2010, utilizando-se uma técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativo alelo-específico, foi encontrada a mutação JAK2 V617F em 320 pacientes (94.6%) pacientes com PV¹⁵(**B**). De maneira semelhante, em estudo conduzido em 1548 pacientes com neoplasias mieloproliferativas, publicado em 2014, foi encontrada a mutação JAK2 V617F em 53.8% dos pacientes com trombocitemia essencial, e 55.8% dos pacientes com mielofibrose¹⁶(**B**). Resultados muito parecidos foram obtidos em estudo brasileiro conduzido em 3 centros distintos com 373 pacientes com TE ou MF¹⁷(**B**). Nesse estudo, foi encontrada a mutação JAK2 V617F em 50.9% dos pacientes com TE e 58.9% dos pacientes com MF. A mutação V617F do JAK2 também pode ser encontrada em outras neoplasias mieloproliferativas e em outras neoplasias hematológicas, porém em prevalência muito inferior. Diferentes estudos mostram prevalência em torno de 3-15% para esta mutação e pacientes com leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), 5-10% para pacientes com leucemia mieloide crônica atípica (LMCa), até 20% para pacientes com neoplasia mieloproliferativa inclassificável e 3-5% para pacientes com LMA e/ou SMD¹⁸⁻²¹(**B**) Desta forma, os resultados obtidos neste estudo revelam que a taxa de positividade da mutação JAK2 V617F em pacientes com NMPs é significativamente diferente do que aquela obtida entre pacientes com outras doenças hematológicas não relacionadas a NMPs e em subtipos mais raros de NMPs; descrevendo, por conseguinte, que a incidência da mutação V617F no gene JAK2 pode ser critério diagnóstico confiável em pacientes com NMPs.

Mutações mais raras do gene JAK2, localizadas no exon 12, podem ser encontradas em pacientes com PV que não apresentam a mutação V617F. Em estudo publicado em 2007, 10 pacientes com PV foram analisados para mutações em toda a região codificante do gene JAK2, e 4 mutações foram encontradas no éxon 12 do gene²²(B). Os pacientes com PV e mutação do gene JAK2 apresentam quadro clínico distinto de pacientes com PV e mutação V617F do JAK2, caracterizada por eritrocitose isolada em medula óssea e sangue periférico, ao contrário dos pacientes com PV JAK2 V617F-positivo que frequentemente apresentam aumento de proliferação das 3 linhagens medulares, trombocitose e leucocitose. Em estudo mais amplo conduzido por Schnittger et al que analisou 15.542 pacientes com suspeita diagnóstica de NMPs, mutações do exon 12 do gene JAK2 foram encontradas em 4.68% dos pacientes com PV (correspondendo a 40% dos casos de suspeita de PV que eram negativos para a mutação V617F)²³(B). Diferente da mutação em ponto V617F que é recorrente, mutações do exon 12 do JAK2 podem ser de diferentes tipos, incluindo inserções, deleções e mutações em ponto. Por isso, a necessidade de se realizar o sequenciamento completo do éxon para a detecção desta alteração. Outra característica distinta das mutações do exon 12 é que elas ocorrem apenas em pacientes com PV, ao contrário da V617F que pode ocorrer em diferentes doenças²²(B).

Entre os 40% dos pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose primária que não apresentam a mutação JAK2 V617F, 3% a 5% apresentam mutação no códon 515 do gene que codifica o receptor de trombopoietina – MPL ²⁴(D). Beer et al., em estudo retrospectivo incluindo 200 pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose primária, verificaram que a mutação MPL foi identificada em 8,5% dos pacientes negativos para a mutação JAK2 V617F ²⁵(B).

Neste estudo, puderam verificar que indivíduos com trombocitemia essencial portadores da mutação MPL, em detrimento àqueles que testaram positivos para a mutação no gene JAK2, apresentaram menores níveis de hemoglobina e maior número de plaquetas ao diagnóstico²⁵(B). Estudo transversal conduzido por Dos Santos et al. em 2011, analisando o efeito das mutações nos genes JAK2 e MPL sobre contagem de leucócitos, plaquetas, nível de hemoglobina e idade verificou que pacientes com diagnóstico de policitemia vera negativos para a mutação JAK2 V617F apresentaram menor número de plaquetas e leucócitos em comparação àqueles que testaram positivos para esta mutação⁷(B). Pacientes com mielofibrose primária positivos para as mutações JAK2 V617F e MPL W515L apresentaram maior grau de fibrose em medula óssea em comparação àqueles negativos para a mutação V617F JAK2⁷(B). A mutação MPL W515L foi detectada em um paciente com mielofibrose primária e outro com trombocitemia essencial.

A ultima mutação que leva a ativação da via JAK-STAT em NMPs a ser descrita foi a mutação do gene CALR. Esta mutação foi encontrada através de estudos de sequenciamento de exoma em pacientes com NMPs que eram negativos para a mutação JAK2 V617F^{26,27}(B). As mutações do gene CALR são sempre mutações do tipo inserção e/ou deleção de nucleotídeos, e sempre ocorrem no exon 9 do gene. A mutação do CALR pode ser encontrada em 25-35% dos pacientes com TE e MF, correspondendo a 65%-88% dos casos destas doenças que não apresentam a mutação V617F do gene JAK2²⁷(B). Portanto, após a mutação JAK2 V617F, a segunda mutação mais frequente em pacientes com TE e MF é a mutação do gene CALR. Em estudo publicado por Klampfl et al, a presença desta mutação foi avaliada em uma coorte combinada de 1107 pacientes com neoplasias hematológicas, e a mutação do CALR foi encontrada apenas em pacientes com TE, MF e raros casos de anemia refratária com

sideroblastos em anel e trombocitose (ARSA-T, uma neoplasia relacionada a TE), indicando ser esta uma mutação bastante específica para o diagnóstico de TE e MF ²⁷(B).

Podemos afirmar com base na literatura médica que mutações do gene JAK2 (exon 12 e V617F), CALR (*frameshift indels no exon 9*) e MPL (principalmente códon W515, mas também outras mutações mais raras) são alterações genéticas com alta sensibilidade para o diagnóstico de NMPs. No processo de avaliação de um paciente com suspeita de NMP, a presença de mutações em um destes 3 genes confirma a clonalidade do processo. Com relação a especificidade, podemos afirmar que a mutação V617F não é específica para nenhum subtipo de NMP, podendo ser encontrada, embora em frequências diferentes, em pacientes com PV, TE e MF. A mutação JAK2 V617F mutação mais específica para o diagnóstico de NMPs porém pode ser encontrada raramente em outras neoplasias mieloides. Comparativamente, mutações do gene MPL e CALR são mais específicas para diagnóstico de TE e MF, assim como mutações do exon 12 do gene JAK2 ocorrem apenas em PV. Embora todas estas mutações sejam consideradas importantes ferramentas no processo diagnóstico de pacientes com suspeita de NMPs, a sua presença isolada é apenas indicativa de um processo neoplásico, e o diagnóstico e classificação correto devem levar em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais do paciente.

Alguns pacientes com Mielofibrose Primária ou Trombocitemia Essencial são considerados “triplo-negativos” para as mutações JAK2 V617F, MPL W515 ou CALR, não sendo estas mutações detectadas pelos métodos convencionais. Estes casos apresentam mais dificuldade diagnóstica e têm importância prognóstica, em especial os pacientes com Mielofibrose Primária, e precisarão ser identificados através da correlação clínica, anatomopatológica e por outros métodos moleculares²⁸(B).

Recentemente, estudos de sequenciamento de última geração encontraram novas mutações dos genes JAK2 e MPL em alguns destes pacientes com TE e MF que eram negativos para mutações do JAK2 V617F, CALR e MPL W515^{29,30}(B). Estas mutações apresentam frequência bem mais baixa nesta população de pacientes, e estudos laboratoriais mostram que as mesmas levam a ativação constitutiva da via JAK-STAT, sendo responsável pelo fenótipo da doença. Em estudo publicado em 2016, aproximadamente 10% de pacientes com TE negativos para mutações conhecidas nos genes JAK2, MPL e CALR apresentavam novas mutações no gene MPL. Em outro estudo, de autoria de Cabagnols et al, 9.3% de pacientes com TE apresentavam mutações não descritas no gene MPL.

Outros estudos reportaram ainda a ocorrência de mutações relacionadas a enzimas envolvidas na metilação do DNA (TET2, DNMT3A e IDH1/2) e genes relacionados à modificação das histonas (EZH2, ASXL1) e splicing de mRNA (SRSF2, U2AF1, SF3B1) em pacientes com neoplasias mieloproliferativas. Todavia, são detectadas principalmente em pacientes com mielofibrose primária. Todas estas mutações podem ser encontradas em maior ou menor prevalência em pacientes com outras neoplasias mieloides³¹(D), não sendo consideradas de forma isolada como específicas para diagnóstico de NMPs.

REFERÊNCIAS

1. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-90. PubMed PMID: 15858187.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054-61. PubMed PMID: 15781101.
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51. Review. PubMed PMID: 19357394.
4. Zhang SP, Li H, Lai RS. Detection of JAK2 V617F mutation increases the diagnosis of myeloproliferative neoplasms. *Oncol Lett*. 2015;9(2):735-738. PubMed PMID: 25624900.
5. Ha JS, Kim YK. Calreticulin exon 9 mutations in myeloproliferative neoplasms. *Ann Lab Med*. 2015;35(1):22-7. PubMed PMID: 25553276.
6. Park SH, Kim SY, Lee SM, Yi J, Kim IS, Kim HH, Chang CL, Lee EY, Song MK, Shin HJ, Chung JS. Incidence, clinical features, and prognostic impact of CALR exon 9 mutations in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis: an experience of a single tertiary hospital in Korea. *Ann Lab Med*. 2015;35(2):233-7. PubMed PMID: 25729726.
7. Dos Santos LC, Ribeiro JC, Silva NP, Cerutti J, da Silva MR, Chauffaille M de L. Cytogenetics, JAK2 and MPL mutations in polycythemia vera, primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(6):417-24. PubMed PMID: 23049357.
8. Payzin KB, Savasoglu K, Alacacioglu I, Ozdemirkiran F, Mutlu BB, Bener S, Calli AO, Kucukzeybek BB, Aksun S. JAK2 V617F mutation status of 232 patients diagnosed with chronic myeloproliferative neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(6):525-33. PubMed PMID: 24811089.
9. Yonal-Hindilerden I, Daglar-Aday A, Akadam-Teker B, Yilmaz C, Nalcaci M, Yavuz AS, Sargin D. Prognostic significance of ASXL1, JAK2V617F mutations and JAK2V617F allele burden in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *J Blood Med*. 2015;6:157-75. PubMed PMID: 26082670.

10. Pósfai É, Marton I, Király PA, Kotosz B, Kiss-László Z, Széll M, Borbényi Z. JAK2 V617F, MPL, and CALR mutations in essential thrombocythaemia and major thrombotic complications: a single-institute retrospective analysis. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(3):751-8. PubMed PMID: 25573593.
11. Schmitt-Graeff AH, Teo SS, Olschewski M, Schaub F, Haxelmans S, Kirn A, Reinecke P, Germing U, Skoda RC. JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica.* 2008;93(1):34-40. PubMed PMID: 18166783.
12. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005;434(7037):1144-8. PubMed PMID: 15793561.
13. Larsen TS, Pallisgaard N, Møller MB, Hasselbalch HC. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. *Eur J Haematol.* 2007 Dec;79(6):508-15. Epub 2007 Oct 23. 17961178
14. Colin J, Houdas Y. Initiation of sweating in man after abrupt rise in environmental temperature. *J Appl Physiol.* 1965 Sep;20(5):984-90. PMID 5837627
15. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, Roncoroni E, Astori C, Merli M, Boggi S, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia.* 2010 Sep;24(9):1574-9. doi: 10.1038/leu.2010.148. Epub 2010 Jul 15. PMID 20631743
16. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, Gangat N, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood.* 2014 Oct 16;124(16):2507-13; quiz 2615. doi: 10.1182/blood-2014-05-579136. Epub 2014 Jul 18. PMID 25037629
17. Monte-Mor Bda C, Ayres-Silva Jde P, Correia WD, Coelho AC, Solza C, Daumas AH, et al. Clinical features of JAK2V617F- or CALR-mutated essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2016 Sep;60:74-7. doi: 10.1016/j.bcmd.2016.03.003. Epub 2016 Mar 8. PMID 26994960
18. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2005 Aug 15;106(4):1207-9. Epub 2005 Apr 28. PMID 15860661
19. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005 Nov 15;106(10):3377-9. Epub 2005 Aug 4. PMID 16081687

20. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa JP. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3370-3. Epub 2005 Jul 21. PMID 16037387
21. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):2162-8. Epub 2005 May 26. PMID 15920007
22. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007 Feb 1;356(5):459-68. PMID 17267906
23. Schnittger S, Bacher U, Eder C, Dicker F, Alpermann T, Grossmann V, Kohlmann A, Kern W, Haferlach C, Haferlach T. Molecular analyses of 15,542 patients with suspected BCR-ABL1-negative myeloproliferative disorders allow to develop a stepwise diagnostic workflow. *Haematologica*. 2012 Oct;97(10):1582-5. doi: 10.3324/haematol.2012.064683. Epub 2012 Apr 17. PMID 22511494
24. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270. PubMed PMID:16834459.
25. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112(1):141-9. PubMed PMID: 18451306.
26. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2391-2405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542. Epub 2013 Dec 10. PMID 24325359
27. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379-90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347. Epub 2013 Dec 10. PMID 24325356
28. Jerry L. Spivak. Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 2017;376:2168-81.
29. Xenia Cabagnols, Fabrizia Favale, Florence Pasquier, Kahia Messaoudi, Jean Philippe Defour, Jean Christophe Ianotto, Christophe Marzac, Jean Pierre Le Cou'edic, Nathalie Droin, Ilyas Chachoua, Remi Favier, M'boyba Khadija Diop, Val'erie Ugo, Nicole Casadevall, Najet Debili, Hana Raslova, Christine Bellann'e-Chantelot, Stefan N. Constantinescu, Olivier Bluteau, Isabelle Plo, and William Vainchenker. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127(3):333-342.

30. Jelena D. Milosevic Feenstra, Harini Nivarthi, Heinz Gisslinger, Emilie Leroy, Elisa Rumi, Ilyas Chachoua, Klaudia Bagienski, Blanka Kubesova, Daniela Pietra, Bettina Gisslinger, Chiara Milanese, Roland Jäger, Doris Chen, Tiina Berg, Martin Schalling, Michael Schuster, Christoph Bock, Stefan N. Constantinescu, Mario Cazzola, and Robert Kralovics. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(3):325-332.
31. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 2013;122(25):4021-34. PubMed PMID: 24136165.
32. Levels of Evidence and Grades of Recommendations - Oxford Centre for Evidence Based Medicine. Disponível em URL: http://cebm.jr2.ox.ac.uk/docs/old_levels.htm
33. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17:1-12.
34. Wells G, Shea B, O'Connell D, Robertson J, Peterson J, Welch V, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. Disponível em: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp
35. Goldet G, Howick J. Understanding GRADE: an introduction. *J Evid Based Med* 2013; 6:50-4.

ANEXO I

1. Dúvida Clínica

Qual o papel das mutações no diagnóstico da mielofibrose primária, policitemia vera e trombocitemia essencial?

2. Critérios de elegibilidade

Os principais motivos de exclusão foram: não respondiam ao PICO e desfechos intermediários.

Sem limite de período consultado.

Estudos nas línguas portuguesa, inglesa, espanhola.

Revisões narrativas, relatos de casos, séries de casos, trabalhos com apresentação de resultados preliminares foram, a princípio, excluídos da seleção. Revisões sistemáticas e meta-análises foram utilizadas com o princípio de recuperação de referências que porventura haviam sido perdidas em primeiro momento a partir da estratégia de busca inicial. Foram incluídos ensaios clínicos controlados randomizados (ECRs) e/ou estudos comparativos observacionais.

3. Busca de Artigos

3.1. Bases de Dados

A base de informação científica consultada foi Medline (via PubMed) e busca manual.

3.2. Identificação de descritores

P	Neoplasias mieloproliferativas
I	Mutações
C	
O	Diagnóstico

3.3. Estratégia de Pesquisa

3.3.1. Estratégia 1: (((essential thrombocythemia OR essential thrombocythaemia OR thrombocytosis OR polycythemia OR erythema OR polycythaemia OR erythrocytosis OR myelofibrosis OR leukemic megakaryocytic myelosis OR myeloid metaplasia OR osteomyelofibrosis OR myelosclerosis)) AND ((mutation* OR molecular abnormalities OR JAK2 OR BCR-ABL OR exon 12 OR MPL OR CALR OR calreticulin))) AND diagnosis/broad[filter]. N=1556.

3.3.2. Estratégia 2: ((essential thrombocythemia OR essential thrombocythaemia OR thrombocytosis OR polycythemia OR erythema OR polycythaemia OR erythrocytosis OR myelofibrosis OR aleukemic megakaryocytic myelosis OR myeloid metaplasia OR osteomyelofibrosis OR myelosclerosis)) AND ((mutation* OR molecular abnormalities OR JAK2 OR BCR-ABL OR exon 12 OR MPL OR CALR OR calreticulin)). N=3736.

3.3.3. Busca manual – Referência das referências, revisões e guidelines.

4. Avaliação Crítica

4.1. Relevância – importância clínica

Essas diretrizes foram preparadas por meio de uma pergunta clinicamente relevante a fim de reunir informações em medicina para padronizar a conduta, a fim de ajudar na tomada de decisões.

4.2. Confiabilidade – Validade interna

A seleção dos estudos, a avaliação dos títulos e resumos obtidos com a estratégia de busca nas bases de informação consultadas foi conduzida de forma independente e cegada, obedecendo rigorosamente aos critérios de inclusão e exclusão, separando-se por fim os trabalhos com potencial relevância. Quando o título e o resumo não fossem esclarecedores, buscou-se o artigo na íntegra. Somente os trabalhos cujos textos completos encontravam-se disponíveis foram considerados para avaliação crítica.

4.3. Aplicação dos resultados – Validade externa

O nível de Evidência Científica foi classificado por tipo de estudo segundo Oxford³² (tabela 02).

A: Estudos experimentais ou observacionais de melhor consistência.
B: Estudos experimentais ou observacionais de menor consistência.
C: Relatos de casos / estudos não controlados.
D: Opinião desprovida de avaliação crítica, baseada em consensos, estudos fisiológicos ou modelos animais.

Tabela 02: Grau de recomendação e força de evidência

A evidência selecionada foi definida como ensaio clínico controlado randomizado (ECR), era submetida a um Check-list apropriado de avaliação crítica (Tabela 03). A avaliação crítica do ECR permite classificá-lo segundo o escore JADAD³³, considerando os ensaios JADAD < três (3) como inconsistentes (grau B), e aqueles com escore $\geq$ três (3), consistentes (grau A).

Quando a evidência selecionada foi definida como estudo comparativo (coortes observacionais ou ensaio clínico não randômico), esta era submetida a um Check-list apropriado de avaliação crítica (Tabela 04), permitindo a classificação do estudo, segundo o escore NEW CASTLE OTAWA SCALE³⁴, considerando os estudos coortes consistentes com escore ≥ 6 e inconsistentes < 6.

Dados do estudo Referência, Desenho de estudo, JADAD, força da evidência	Cálculo da amostra Diferenças estimadas, poder, nível de significância, total de pacientes
Seleção dos pacientes Critérios de inclusão e exclusão	Pacientes Recrutados, randomizados, diferenças prognósticas
Randomização Descrição e alocação vendada	Seguimento dos pacientes Tempo, perdas, migração
Protocolo de tratamento Intervenção, controle e cegamento	Análise Intenção de tratamento, analisados intervenção e controle
Desfechos considerados Principal, secundário, instrumento de medida do desfecho de interesse	Resultado Benefício ou dano em dados absolutos, benefício ou dano em média

Tabela 03 - Roteiro de avaliação crítica de ensaios clínicos controlados randomizados

Representatividade dos expostos e seleção dos não expostos (máx. 2 pontos)	Definição da exposição (máx. 1 ponto)	Demonstração de que o desfecho de interesse não estava presente no início do estudo (máx. 1 ponto)	Comparabilidade de na base do desenho ou da análise (máx. 2 pontos)	Avaliação do desfecho (máx. 1 ponto)	Tempo apropriado de seguimento (máx. 2 pontos)	Escore e nível da evidência
---	--	---	--	---	---	-----------------------------

Tabela 04 - Roteiro de avaliação crítica de estudos coortes

5. Método de Extração e Análise dos resultados

Para resultados com evidência disponível serão definidos de maneira específica, sempre que possível, a população, a intervenção, os desfechos, a presença ou ausência de benefício e/ou dano e as controvérsias.

Os resultados serão expostos preferencialmente em dados absolutos, risco absoluto, número necessário para tratar (NNT), ou número para produzir dano (NNH), e eventualmente em média e desvio padrão (tabela 05).

Evidência incluída
Desenho do estudo
População selecionada
Tempo de seguimento
Desfechos considerados
Expressão dos resultados: porcentagem, risco, odds, hazard ratio, média

Tabela 05 - Planilha utilizada para descrição e exposição dos resultados de cada estudo

6. Resultados

Trabalhos recuperados (05/2017)

BASE DE INFORMAÇÃO	NÚMERO DE TRABALHOS
Primária	
PubMed-Medline #1	1556
PubMed-Medline #2	3736

Tabela 06 – Número de trabalhos recuperados com as estratégias de busca utilizadas para cada base de informação científica

7. Aplicação da evidencia – Recomendação

As recomendações serão elaboradas pelos autores da revisão, com a característica inicial de síntese da evidência, sendo submetida a validação por todos os autores participantes da elaboração da Diretriz.

A evidência disponível seguirá alguns princípios de exposição:

- Será pelo desfecho;
- Terá como componentes: o número de pacientes, o tipo de comparação, a magnitude e a precisão (desvio padrão e IC95%).

A síntese global será elaborada considerando a evidência descrita e terá a sua força estimada (Oxford³²/GRADE³⁵) em 1b e 1c (graus A) ou forte e em 2a, 2b e 2c (graus B) ou moderada ou fraca ou muito fraca.

8. Conflito de interesse

Não há nenhum conflito de interesse relacionado a esta revisão a ser declarado por nenhum dos autores.

9. Declaração final

O Projeto Diretrizes, iniciativa da Associação Médica Brasileira em conjunto com as Sociedades de Especialidades, tem por objetivo conciliar informações da área médica a fim de padronizar condutas que auxiliem o raciocínio e a tomada de decisão do médico. As informações contidas neste projeto devem ser submetidas à avaliação e à crítica do médico, responsável pela conduta a ser seguida, frente à realidade e ao estado clínico de cada paciente.



APOIO AMB E SOCIEDADES DE ESPECIALIDADES