



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

BRUNO KOSA LINO DUARTE

DINÂMICA CLONAL EM NEOPLASIAS MIELOIDES

CLONAL DYNAMICS IN MYELOID NEOPLASMS

**CAMPINAS
2020**

BRUNO KOSA LINO DUARTE

DINÂMICA CLONAL EM NEOPLASIAS MIELOIDES

CLONAL DYNAMICS IN MYELOID NEOPLASMS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração Clínica Médica

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of State University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for Doctor degree in Internal Medicine.

ORIENTADOR: MARGARETH CASTRO OZELO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO BRUNO KOSA LINO DUARTE, E ORIENTADA PELA
PROF^a. DR^a. MARGARETH CASTRO OZELO

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

D85d Duarte, Bruno Kosa Lino, 1984-
Dinâmica clonal em neoplasias mieloides / Bruno Kosa Lino Duarte. –
Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Margareth Castro Ozelo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Leucemia mieloide aguda. 2. Transtornos mieloproliferativos. 3. Células-
tronco. 4. Evolução clonal. I. Ozelo, Margareth Castro, 1970-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Clonal dynamics in myeloid neoplasms

Palavras-chave em inglês:

Leukemia, Myeloid, Acute

Myeloproliferative disorders

Stem cells

Clonal evolution

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Margareth Castro Ozelo [Orientador]

Eduardo Magalhães Rego

Sara Terezinha Olalla Saad

Vanderson Geraldo Rocha

Fabíola Traina

Data de defesa: 17-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6155-3253>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7607152265515952>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
BRUNO KOSA LINO DUARTE

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. MARGARETH CASTRO OZELO

MEMBROS:

- 1. PROF^a. DR^a. MARGARETH CASTRO OZELO**
- 2. PROF. DR. EDUARDO MAGALHÃES REGO**
- 3. PROF. DR. VANDERSON GERALDO ROCHA**
- 4. PROF^a. DR^a. SARA TERESINHA OLALLA SAAD**
- 5. PROF^a. DR^a. FABÍOLA TRAINA**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 17/02/2020

Dedico este trabalho a minha irmã e a todos aqueles que convivem e conviveram com doenças tão devastadoras como as leucemias agudas. Que o contínuo e imprevisível avanço das Ciências Biológicas e da Medicina possa trazer mais respostas e conforto para estes aguerridos indivíduos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2014/00984-3.

Numa jornada tão longa e cheia de aprendizados como foi esta, o apoio dos colegas, amigos e familiares é fundamental. Agradeço a todos que, ao longo desses anos, contribuíram de inúmeras maneiras para que este projeto fosse concretizado. De maneira nominal, gostaria de oferecer meus agradecimentos a alguns deles, sem prejuízo dos demais:

À Roberta Casagrande Saez

Por seu cuidado, dedicação e os primeiros ensinamentos sobre culturas de células.

À Stephanie Ospina-Prieto

Pela parceria, ensinamentos, apoios e contribuições fundamentais para a construção deste trabalho.

À Lúcia Helena Siqueira

Por compartilhar um pouco da sua infinita experiência com biologia molecular.

À Jéssica Oliveira Frade,

Pela leveza, empenho e disponibilidade.

À toda equipe dos laboratórios que me auxiliaram nos experimentos: Priscila Soares, Beatriz Martinelli, Lauanda Monteiro, Silmara Montalvão, Ana Paula Leda Longhini, Carolina Lanaro, Dulcinéia Martins de Albuquerque e Bárbara de Andrade

Pelo auxílio, disponibilidade e por emprestarem sua expertise, tão importante para este trabalho.

À colega Kátia Borgia Barbosa Pagnano

Pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Pela inestimável contribuição material e intelectual.

Ao Prof. Dr. Michael J Rauh

Por me apresentar ao mundo do sequenciamento massivamente paralelo e pela generosidade em todas as nossas colaborações.

À minha orientadora Profa. Dra. Margareth Castro Ozelo

Por toda a dedicação, oportunidades, conselhos e desafios dos últimos anos e principalmente por sempre me lembrar o valor da persistência.

À irmã que a vida me deu Gabriela Góes Yamaguti-Hayakawa

Pela amizade, carinho e inabalável apoio em todas as coisas.

Ao meu grande amigo Fernando Vieira Pericole de Souza

Pelo companheirismo, inspiração, e ensinamentos que me tornaram o Hematologista que sou hoje.

À amiga Mariana Munari Magnus

Pelos cafés e por me ouvir.

Aos pacientes

Pela sua humildade, disponibilidade e ensinamentos

Aos colegas médicos residentes com quem tive a oportunidade de conviver

Pela amizade, companheirismo e pelos inúmeros ensinamentos

À minha irmã Carla

Por ser a razão e o começo de tudo isso. Por ter me ensinado o significado de força e resiliência.

Aos meus pais Edison e Telma

Por tudo que me ensinaram, pelo tanto que se dedicaram e por todo o amor que sempre me deram. Ao meu pai, por ter me ensinado a importância da dignidade, do valor da palavra e da honestidade. À minha mãe, por ter me ensinado valor do respeito, da empatia e do carinho.

Ao meu filho Gabriel

Por ter me ensinado mais nesse 1 ano e meio do que eu aprendi a vida inteira.

À minha esposa Isabella

Por ter sido tudo que eu precisei, sem cobrar ou questionar; companheira, rocha inabalável, esposa e mãe. Obrigado por me fazer ser um homem melhor, meu amor.

RESUMO

Neoplasias mieloides (NM) são proliferações clonais de células mieloides que se manifestam como três doenças principais: as neoplasias mieloproliferativas (NMP), a leucemia mieloide aguda (LMA) e as síndromes mielodisplásicas (SMD).

O avanço das técnicas de sequenciamento possibilitou a descoberta de novos mecanismos de evolução clonal, como a predisposição genética a NM, entre elas as mutações germinativas no gene *RUNX1* e as mutações condutoras em NMP, envolvendo os genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*.

A descrição destas mutações permitiu a identificação de um grupo de pacientes portadores de NMP negativos para estas, e a observação de um maior risco de eventos tromboembólicos nos pacientes portadores da mutação *JAK2V617F*. Não está claro, porém, se essa mutação é expressa em células endoteliais e qual impacto isso acarretaria.

Assim, o presente trabalho teve o objetivo de: 1) avaliar os mecanismos clonais pelos quais pacientes portadores de mutações germinativas no gene *RUNX1* apresentam transformação para NM; 2) avaliar a expressão da mutação *JAK2V617F* em células endoteliais formadoras de colônias (ECFCs) de pacientes com NMP *JAK2V617F*⁺ bem como seu comportamento *in vitro*, com relação à adesão a hemácias, migração e angiogênese e 3) avaliar a presença de mutações adicionais em pacientes com NMP triplo negativas.

Com relação ao objetivo 1, 3 pacientes de 2 famílias com antecedente de LMA/SMD e DNA disponível ao diagnóstico foram submetidos ao sequenciamento de 48 genes relacionados a neoplasias mieloides. Um dos pacientes apresentou uma mutação no alelo previamente não mutado do *RUNX1*, além de uma mutação no gene *NFE2*. Os demais apresentaram mutações em outros genes. Uma revisão sistemática identificou a aquisição de uma mutação somática do *RUNX1* ou aquisição de mutações em outros genes como os dois mecanismos para transformação para NM.

Com relação ao objetivo 2, a pesquisa da mutação *JAK2V617F* nas ECFCs de 8/9 pacientes com isolamento bem-sucedido foi negativa. Na comparação com as ECFCs controle, ECFCs de pacientes com NMP *JAK2V617F*⁺ apresentaram maior adesão estática às hemácias, menor capacidade de migração e de angiogênese.

Diante das diferenças funcionais não relacionadas à expressão da mutação *JAK2V617F* foi realizada avaliação da expressão gênica de ECFCs de indivíduos saudáveis e portadores de NMP *JAK2V617F*⁺ com um RT PCR array para 168 genes. Foram observados aumento da expressão do gene *ADAM17* e *KDR* e redução da expressão do gene *WNT5A*. Para validar o achado do aumento de expressão de *ADAM17* nas ECFCs foi realizada dosagem deste analito no plasma de 91 pacientes com NMP e 37 controles. As concentrações plasmáticas de *ADAM17* foram maiores em indivíduos portadores de NMP em relação a controles (173,9 pg/ml vs. 71,44 pg/ml; P=0,01).

Finalmente, com relação ao objetivo 3, 21 pacientes diagnosticados com trombocitemia essencial sem mutações nos genes *JAK2*; *MPL*; *CALR* no período entre 2007 e 2016 foram submetidos a sequenciamento de 48 genes relacionados a neoplasias mieloides para identificação de mutações em genes adicionais. Desses, 3 não apresentavam qualidade adequada de DNA para sequenciamento. Dos 18 restantes, 4 (22%) apresentavam mutações em *JAK2* (2); *MPL* (1) e *CALR* (1).

PALAVRAS-CHAVE: Leucemia mieloide aguda; transtornos mieloproliferativos; células-tronco; evolução clonal

ABSTRACT

Myeloid neoplasms (MM) are clonal proliferations of myeloid cells presenting as three main diseases: acute myeloid leukemia (AML); myeloproliferative neoplasms (MNP) and myelodysplastic syndromes (MDS).

The advances in DNA sequencing have led to the discovery of new mechanisms of clonal evolution, such as the genetic predisposition to MM, among each germline mutations in *RUNX1* and the driver mutations in MPNs in the *JAK2*, *CALR* and *MPL* genes.

The identification of the abovementioned mutations has led to the identification of triple negative MPN patients, as well as a higher risk of thromboembolic events in patients with *JAK2V617F*⁺ MPN. These findings raised the question of whether this mutation is expressed in the endothelial cells and how this could impact their function.

Accordingly, this thesis had the following objectives: 1) assess the mechanisms by which germline *RUNX1* mutated patients progress to MM; 2) evaluate both the expression of the *JAK2V617F* mutation in endothelial colony forming cells (ECFCs) from patients with *JAK2V617F*⁺ MPN as well as the *in vitro* functional characteristics of these cells regarding static adhesion to red blood cells, migration and angiogenesis; 3) assess additional mutations in triple negative MPN.

Regarding our first objective, 3 patients from 2 families with prior MDS/AML and available DNA at diagnosis were submitted to targeted sequencing with a 48 gene panel. One of the patients had an additional mutation in the wildtype *RUNX1* allele and a mutation in *NFE2*. The remaining patients had mutations in other recurrently mutated genes. A systematic review identified the acquisition of a somatic *RUNX1* mutation or an acquisition of mutation in other genes as the two mechanisms for transformation into MM.

Regarding objective number 2, we did not detect the *JAK2V617F* mutation in ECFCs from 8/9 MPN patients with a successful isolation. ECFCs from *JAK2V617F*⁺ MPN patients had a higher static adhesion to red blood cells and a lower migration and angiogenesis capacity.

To better explore these differences in their *in vitro* behavior, we assessed gene expression of ECFCs from both patients and healthy individuals with a PCR array for 168 genes. We found a higher expression of *ADAM17* and *KDR*, and reduction of the expression of *WNT5A*. To validate our findings, we measured plasma levels of ADAM17 in an expansion cohort comprising 91 MPN patients (regardless of the *JAK2V617F* status) and 37 healthy individuals. Plasma levels of ADAM17 were greater in MPN patients vs. controls (173.9 pg/ml vs. 71.44 pg/ml, P=0.01).

Finally, regarding objective 3, 21 patients diagnosed with essential thrombocythemia without *JAK2*, *MPL* and *CALR* mutations diagnosed between 2007 and 2016 were submitted to targeted sequencing of 48 genes related to myeloid neoplasms for the identification of additional mutations. Three of these patients had insufficient DNA for sequencing. Of the remaining 18, 4 (22%) had mutations in the classical driver genes: *JAK2* (2); *MPL* (1) and *CALR* (1).

KEYWORDS: Acute myeloid leukemia; myeloproliferative disorders; stem-cells; clonal evolution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** - Ontogenia e possíveis relações das células endoteliais e hematopoiéticas (Adaptado de Bautch VL (127)). 39
- FIGURA 2** - Estratégias de cultura para obtenção de precursores endoteliais. No método A, células mononucleares (MNC-SP) são obtidas do sangue periférico e cultivadas em meio específico. As células não aderentes são transferidas para outra placa com o mesmo meio de cultura e rapidamente tem-se o crescimento de células de fenótipo endotelial (células mieloides angiogênicas – MAC). No método B, células mononucleares são cultivadas em meio específico. As células não aderidas são descartadas e cerca de 14-21 dias depois, surgem células de fenótipo endotelial e morfologia específicas (ECFCs - células formadoras de colônias endoteliais). Adaptado de Prater et al. (136). 42
- FIGURA 3** - Desenho esquemático do layout da placa utilizada para os ensaios de adesão. Os poços em branco e azul representam poços vazios. **RBC**: hemácias; **ECFCs**: células formadoras de colônia endotelial. **TNF α** : fator de necrose tumoral α 64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Critérios diagnósticos para neoplasias mieloproliferativas <i>BCR-ABL1</i> negativas	20
TABELA 2 - Modelos prognósticos para pacientes com MFP	23
TABELA 3 - Classificação OMS 2016 das SMDs	26
TABELA 4 - Escore prognóstico utilizado para pacientes com SMD (R-IPSS)	27
TABELA 5 - Classificação OMS 2016 da LMA e neoplasias relacionadas	29
TABELA 6 - Classificação de risco de LMA - ELN 2017	30
TABELA 7 - Classificação OMS 2016 das neoplasias mieloides com predisposição germinativa	36
TABELA 8 - Características dos diferentes precursores endoteliais circulantes	41
TABELA 9 - Ensaio Taqman para a mutação <i>JAK2V617F</i>	51
TABELA 10 - Primers utilizados para ensaio de PCR para <i>JAK2V617F</i> por análise de fragmentos	51
TABELA 11 - Cobertura do painel de sequenciamento para neoplasias mieloides .	53
TABELA 12 - Primers utilizados para detecção de mutações nos genes de interesse	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL1: *abelson murine leukemia*

BCR: *breaking cluster region*

BOEC: *blood-outgrowth endothelial cells* (células endoteliais oriundas do sangue)

CDC25C: *cell division cycle 25C*

CE: células endoteliais

CEP: células endoteliais progenitoras

CFU-Hill: unidade formadora de colônia endotelial Hill

COSMIC: *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*

CRT: *cyclic reversible termination* (terminação cíclica reversível)

CSF3R: *colony stimulating factor 3 receptor*

CUX1: *cut like homeobox 1*

ddNTPs: trifosfatos de didesoxinucleotídeos

dNTPs: trifosfatos de desoxinucleotídeos

DIPSS: *Dynamic International Prognostic Scoring System* para pacientes com MFP

ECFC: *endothelial colony-forming cells* (células formadoras de colônias endoteliais)

EPO: eritropoetina

FPD: *familial platelet disorders* (trombocitopenia familiar)

JAK2: Janus kinase 2

HBSS: *Hank's balanced salt solution* (solução salina balanceada de Hank)

Hb: hemoglobina

Ht: hematócrito

HUVEC: *human umbilical vein endothelial cells* (células endoteliais da veia umbilical humana)

IPSS: *International Prognostic Scoring System* para pacientes com MFP

IPSET: *International Prognostic Score for Essential Thrombocythemia*

LDH: lactato desidrogenase

LMA: leucemia mieloide aguda

LMA-ELN: classificação de risco para LMA pela *European Leukemia Net*

MAC: *myeloid angiogenic cells* (células mieloides angiogênicas)

MFP: mielofibrose primária

MPL: *myeloproliferative leukemia virus*

NGS: *next-generation sequencing* (sequenciamento de próxima geração)

NFE2: *nuclear factor, erythroid 2*

NMP: neoplasias mieloproliferativas

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PLT: plaquetas

PRISMA: *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*

PV: policitemia vera

R-IPSS: *Revised International Prognostic Scoring System* para pacientes com SMD

q.s.p.: quantidade suficiente para

RUNX1: *Runt related transcription factor 1*

SMD: síndromes mielodisplásicas

SNA: *single nucleotide addition* (adição de um único nucleotídeo)

SNP: *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de um único nucleotídeo)

TACPH: transplante de células progenitoras hematopoiéticas

TCGA: *The Cancer Genome Atlas* (Projeto Atlas do Genoma do Câncer)

TE: trombocitemia essencial

TET2: *tet methylcytosine dioxygenase 2*

TN: triplo negativo

WES: *whole-exome sequencing* (sequenciamento completo do exoma)

WGS: *whole-genome sequencing* (sequenciamento completo do genoma)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. NEOPLASIAS MIELOIDES	18
1.1.1. Neoplasias mieloproliferativas	18
1.1.2. Síndromes mielodisplásicas	24
1.1.3. Leucemia mieloide aguda	28
1.2. DINÂMICA CLONAL EM NEOPLASIAS MIELOIDES	31
1.2.1. O sequenciamento massivamente paralelo e sua contribuição para o estudo da dinâmica clonal	32
1.2.2. Dinâmica clonal em neoplasias mieloides: predisposição relacionada a mutações germinativas	35
1.2.3. A dinâmica clonal em neoplasias mieloides: clonalidade endotelial e fisiopatologia da trombose em neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas	38
1.2.4. Dinâmica clonal em neoplasias mieloides: identificação de mutações em pacientes com trombocitemia essencial BCR-ABL1 negativa sem mutações em genes clássicos	43
2. OBJETIVOS	46
2.1. OBJETIVO GERAL	46
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. METODOLOGIA	47
3.1. CASUÍSTICA	47
3.1.1. Subprojeto 1 – Avaliação do impacto da aquisição de mutações somáticas no desenvolvimento e progressão de neoplasias mieloides em pacientes portadores de plaquetopenia hereditária relacionada a mutações germinativas do RUNX1	47
3.1.2. Subprojeto 2 - Avaliação da presença da mutação JAK2V617F nas células endoteliais formadoras de colônia de portadores de neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas e seu impacto na função destas	47
3.1.3. Subprojeto 3 - Avaliar a presença de mutações relacionadas a neoplasias mieloides em pacientes com trombocitemia essencial negativa para as mutações dos genes JAK2, MPL e CALR, bem como a utilidade diagnóstica do uso do sequenciamento massivamente paralelo numa coorte destes pacientes	48
3.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE LEUCÓCITOS, ECFCS E DE CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA ORAL	48
3.3. GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO JAK2V617F POR PCR TEMPO REAL	50
3.4. GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO JAK2V617F POR PCR POR RESTRIÇÃO DE FRAGMENTO	51
3.5. SEQUENCIAMENTO MASSIVAMENTE PARALELO (NGS)	52
3.6. GENOTIPAGEM DE MUTAÇÕES NOS GENES RUNX1, CSF3R, TET2, CDC25C E CUX1	55
3.6.1. Extração do RNA	56
3.6.2. Síntese de cDNA	56
3.6.3. Amplificação das sequências gênicas específicas	57
3.6.4. Identificação das alterações moleculares nos genes de interesse	59
3.7. CLONAGEM GÊNICA PARA DETERMINAÇÃO DO STATUS CIS OU TRANS DA MUTAÇÃO RUNX1	60
3.8. ISOLAMENTO DAS ECFCS	61
3.9. HUVECs	62
3.10. CARACTERIZAÇÃO DAS ECFCS	62
3.11. ENSAIO DE ADESÃO ESTATICA DE ECFCS APÓS COCULTURA COM HEMÁCIAS	63
3.12. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS ECFCS	64
3.13. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ANGIOGÊNESE DAS ECFCS	65
3.14. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ECFCS POR ARRAY DE PCR	65
3.15. DOSAGEM PLASMÁTICA DE CITOCINAS, PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA COAGULAÇÃO E MOLÉCULAS DE ADESÃO	67
3.16. DOSAGEM PLASMÁTICA DE ADAM17 E VEGF	68
3.17. REVISÃO SISTEMÁTICA	69
3.18. ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
4. RESULTADOS	71

LONGITUDINAL SEQUENCING OF <i>RUNX1</i> FAMILIAL PLATELET DISORDER: NEW INSIGHTS INTO GENETIC MECHANISMS OF TRANSFORMATION TO MYELOID MALIGNANCIES	71
ADAM17 EXPRESSION CORRELATES WITH THE INCREASED ADHESION OF RED BLOOD CELLS TO ENDOTHELIAL COLONY-FORMING CELLS LACKING <i>JAK2V617F</i> IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS.....	88
CRITICAL APPRAISAL OF THE CLINICAL UTILITY OF NGS IN TRIPLE NEGATIVE ESSENTIAL THROMBOCYTHEMIA: REPORT OF 21 CASES AND SYSTEMATIC REVIEW	121
5. DISCUSSÃO.....	144
6. CONCLUSÃO	147
7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DO ALUNO DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO.....	148
7.1. RELATIVA A ESTA TESE.....	148
7.1.1. <i>Artigos científicos</i>	148
7.1.2. <i>Apresentação de trabalhos e palestras em congressos</i>	148
7.2. GERAL	149
7.2.1. <i>Artigos científicos</i>	149
7.2.2. <i>Apresentação de trabalhos e palestras em congressos</i>	150
8. REFERÊNCIAS	152
9. ANEXOS.....	171

1. INTRODUÇÃO

1.1. NEOPLASIAS MIELOIDES

As neoplasias mieloides são um grupo de neoplasias caracterizadas pela proliferação de células dessa linhagem e representadas por três diagnósticos principais: as síndromes mielodisplásicas (SMD), as neoplasias mieloproliferativas (NMP) e a leucemia mieloide aguda (LMA).

1.1.1. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) compreendem um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação clonal de células-tronco hematopoiéticas da linhagem mieloide, resultando na proliferação de células maduras de um ou mais tipos celulares desta linhagem. A repercussão laboratorial deste fenômeno é o achado, em graus variáveis, de leucocitose, plaquetose e eritrocitose (1).

Elas se dividem em dois grupos principais: as NMP relacionadas à translocação *BCR-ABL1*, representadas exclusivamente pela leucemia mieloide crônica (LMC) e aquelas não associadas a essa translocação, representadas principalmente pela Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP).

A LMC caracteriza-se pela proliferação acentuada de células maduras da linhagem mieloide, principalmente das séries granulocítica e megacariocítica. Sua incidência anual é de 1 a 2 casos por 100 mil, com mediana de idade estimada em 68 anos (2). Seu curso clínico é predominantemente assintomático e os sintomas, quando presentes, incluem perda de peso, mal-estar, sintomas relacionados à anemia, saciedade precoce e dor no hipocôndrio esquerdo, os dois últimos associados à esplenomegalia (3). Raramente, manifestações associadas à leucocitose extrema podem ocorrer (4).

Sua fisiopatologia está relacionada à translocação *BCR-ABL1*, que produz uma proteína tirosinoquinase constitutivamente ativada que promove crescimento e replicação através de diversas vias de sinalização, incluindo RAS, MYC e STAT (5-7).

Apesar da apresentação clínica oligossintomática, virtualmente 100% dos casos, se não adequadamente tratados, evoluirão para LMA (8). Nesse sentido, o

advento de um inibidor de tirosinoquinase específico para a proteína BCR-ABL1, o imatinibe, representou um grande avanço no tratamento dessa doença (9).

As NMP *BCR-ABL1* negativas, por sua vez, caracterizam-se justamente pela ausência da translocação presente na LMC, estando frequentemente associadas a mutações somáticas em três genes. A mais frequente acomete o gene *JAK2* (9p24). Sua forma mais comum, envolvendo o domínio não catalítico no éxon 14, a *JAK2V617F*, encontra-se associada a 96% dos casos de PV, 55% dos casos de TE e 65% dos casos de MFP (10). Mutações em outros dois genes, o *MPL* (1p34.2) e o *CALR* (19p13.13) estão associadas, respectivamente, a 5 e 25-35% dos casos de TE e MFP (11).

Assim como na LMC, essas mutações produzem ativação constitutiva de vias de sinalização fisiológicas, levando à proliferação de precursores hematopoiéticos (12). Contrariamente à LMC, porém, essas neoplasias apresentam uma evolução habitualmente mais lenta e benigna, sendo principalmente caracterizadas pela ocorrência de eventos trombóticos e menos frequentemente pela evolução para fibrose e leucemia aguda (1). Uma vez que elas compartilham as mesmas mutações condutoras (i.e.: *driver mutations*), apresentam fisiopatologia e apresentação clínica semelhantes, e muitas vezes superponíveis, tendo havido, historicamente, diversos critérios diagnósticos para distinção entre PV, MFP e TE, sendo o mais recente o da OMS (13); publicado em 2016 (**TABELA 1**).

A PV é a NMP mais comum, com uma incidência estimada de 1,2 por 100 mil e se destaca das demais pela expansão das três séries da linhagem mieloide, principalmente pelo aumento da massa eritrocitária (14). Dada a capacidade de expansão trilinear, pode mimetizar e evoluir para as demais NMP (15). Embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, a idade média dos pacientes é de 60 anos, com leve predominância do sexo masculino (1,2:1) (16).

A morbimortalidade associada a esta doença deriva principalmente da ocorrência de eventos trombóticos, tanto arteriais quanto venosos, sendo a NMP em que estes são mais comuns (14). Entre os sítios mais acometidos por trombooses venosas, estão sítios raros, como o território esplâncnico e sistema nervoso central (17, 18). A evolução para fase fibrótica e leucemia aguda é menos frequente que na mielofibrose pré-fibrótica, por exemplo (19).

TABELA 1 - Critérios diagnósticos para neoplasias mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas

		Mielofibrose primária	
		Pré-fibrótica (preMFP)	Fibrótica
Policitemia vera	Trombocitemia essencial		
Hb > 16,5 (♂) ou 16,0 g/dl (♀); ou Ht > 49% (♂) ou 48% (♀) ou ↑ de massa eritrocitária	PLT ≥ 450 x 10 ⁹ /L	—	—
1			
Medula óssea hiper celular com expansão das três séries e pleomorfismo de megacariócitos	Proliferação de megacariócitos com predomínio de formas grandes, maduras e com núcleo hipelobobulado; fibrose de reticulina ≤ grau 1.	Proliferação de megacariócitos com atipias; fibrose de reticulina ≤ grau 1 ; aumento da celularidade, proliferação granulocítica, e frequentemente, redução da eritropoiese.	Proliferação de megacariócitos com atipias; fibrose de reticulina ≤ grau 1 ; aumento da celularidade, proliferação granulocítica, e frequentemente, redução da eritropoiese.
2			
3	-	Não preenche critérios OMS para LMC; PV; MFP; SMD ou outra neoplasia mieloide	
Mutações JAK2V617F ou no éxon 12	Mutações em JAK2/CALR/MPL	Mutações em JAK2/MPL/CALR ou presença de outro marcador clonal ou ausência de evidência de fibrose de reticulina reativa	
4			
Níveis de EPO subnormais	Marcador clonal ou ausência de evidência de trombocitose reativa	Anemia sem relação com outras comorbidades	
1			
2	—	—	LDH aumentado
3	—	—	Leucocitose ≥ 11 x 10 ⁹ /L
4	—	—	Esplenomegalia palpável
5	—	—	Leucoeritroblastose

O diagnóstico de PV requer os 3 critérios principais, ou os 2 primeiros principais e o menor. O diagnóstico de TE requer os 4 critérios principais ou os 3 primeiros principais e o menor. O diagnóstico de MFP requer os 3 critérios principais e pelo menos um menor.

O controle do hematócrito, visando a um alvo menor que 45%, e a antiagregação plaquetária constituem os pilares terapêuticos (20). A escolha entre flebotomia terapêutica e o uso de citorredutores como a hidroxiureia baseia-se no risco trombótico, conforme definido pelo antecedente de trombose e pela idade > 60 anos (14). Recentemente, o uso do interferon α peguilado e do ruxolitinibe emergiram como opções terapêuticas para indivíduos jovens de alto risco e pacientes refratários ou intolerantes a outras terapêuticas (21, 22).

A TE, por sua vez, caracteriza-se pela expansão clonal de precursores hematopoiéticos envolvendo principalmente a linhagem megacariocítica, resultando no achado característico de trombocitose. Com uma incidência de 0,6-1,8 por 100 mil (23), a TE tem como principais manifestações clínicas a ocorrência de eventos hemorrágicos, principalmente com contagens plaquetárias elevadas, particularmente acima de $1.250 \times 10^9/L$ (24), e de eventos trombóticos, com acometimento preferencial de territórios arteriais (25). Apresenta o melhor prognóstico entre as três NMP *BCR-ABL1* negativas, com uma mediana de sobrevida global de 14,7 anos, e um risco de evolução para fase fibrótica e leucemia aguda em 15 anos de 9 e 2%, respectivamente (25). Apesar disso, seus portadores ainda apresentam uma expectativa de vida inferior à da população geral (26).

O tratamento da TE é similar ao tratamento da PV, no que se baseia na antiagregação plaquetária e na citorredução para controle da contagem de plaquetas (20). Assim como na PV, o uso de interferon α peguilado encontra um papel na população jovem de alto risco (21), mas o uso de ruxolitinibe não parece ser superior à hidroxiureia (27). Distingue-se da PV, porém, pelas indicações para o uso da terapia citorrredutora, que se baseiam na estratificação do risco trombótico do paciente. Classicamente essa estratificação era realizada como na PV, considerando-se o antecedente de trombose e a idade (28). Mais recentemente, dois outros sistemas de estratificação foram propostos, o *International Prognostic Score for Essential Thrombocythemia* (IPSET) e o IPSET revisado (29, 30). Ambos incorporam a presença da mutação *JAK2V617F* como importante preditor do risco de trombose, sendo que o IPSET também valoriza a presença de fatores de risco cardiovasculares: hipertensão arterial, diabetes mellitus e tabagismo atual. O IPSET é o escore mais adotado e tem seu uso recomendado pelo *European Leukemia Net* (20).

Por último, a MFP caracteriza-se por um curso bifásico, com uma fase inicial com mieloproliferação clonal, cuja expressão laboratorial principal é o achado de

plaquetose com ou sem leucocitose (1). Esta, pela ocorrência de fibrose medular reativa, osteoesclerose, angiogênese e hematopoiese extramedular, associadas a um perfil anômalo de expressão de citocinas, evolui para uma fase fibrótica, caracterizada por anemia grave, hepatoesplenomegalia de grande monta, reação leucoeritroblástica e sintomas constitucionais (febre, sudorese noturna, perda ponderal) (31).

Sua incidência, na forma pré-fibrótica, é estimada entre 0,34 a 0,65 por 100 mil (23), sendo a menos comum das NMP. Por outro lado, as características supracitadas, associadas a uma frequente evolução para fibrose e leucemia aguda (12,3 e 5,8% em 10 anos, respectivamente) tornam a sobrevida global desta patologia significativamente pior do que as de PV e TE, com medianas de 11,2 anos para a fase pré-fibrótica e 6 anos para a fase fibrótica (32, 33). Embora com menor incidência, dado o risco competitivo de óbito por progressão para fibrose e transformação para leucemia aguda, a MFP, assim como a PV e a TE, apresenta risco elevado de eventos trombóticos, sem preferência por território arterial ou venoso (34).

Dado o curso clínico mais agressivo, e ao mesmo tempo heterogêneo, da MFP, seu tratamento dispõe de múltiplas opções, abrangendo da observação ao transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH). Fundamental na escolha da estratégia terapêutica mais adequada é a estratificação prognóstica. A **TABELA 2** resume os modelos de estratificação mais utilizados na MFP.

Os pacientes com risco baixo e intermediário-1 são habitualmente conduzidos com observação ou terapêuticas específicas direcionadas a sintomas secundários à proliferação celular (35). Dentre as opções terapêuticas para esses sintomas estão: a) eritropoietina, para tratamento de anemia sintomática, a depender dos níveis séricos de eritropoietina do paciente; b) andrógenos; c) danazol; d) talidomida e e) prednisona (36). Os sintomas constitucionais e a esplenomegalia podem ser mitigados com uso de terapia citorredutora, como hidroxiureia, inibidores de JAK2, como o ruxolitinibe (37) e eventualmente com esplenectomia. Mais raramente, e em desuso, está a radioterapia para tratamento de hematopoiese extramedular localizada (36).

Pacientes com risco intermediário-2 e alto risco devem ser considerados para a realização de TACPH e, se inelegíveis, conduzidos conforme acima, de acordo com os sintomas constitucionais predominantes (38). Finalmente, com relação à prevenção de eventos trombóticos, a decisão terapêutica deve levar em consideração o risco destes e o antecedente ou não de sangramentos: pacientes com < 60 anos, sem fatores de risco cardiovascular, sem mutação *JAK2V617F* e sem leucocitose ou

sintomas microvasculares podem ser apenas observados. Pacientes com algum desses fatores, na ausência de sangramentos prévios, devem receber antiagregação plaquetária. Caso o paciente já tenha apresentado um episódio ou tenha elevado risco de sangramentos, a terapêutica citorrredutora deve ser priorizada como estratégia de prevenção de trombose, principalmente em pacientes com leucocitose/plaquetose (39).

TABELA 2 - Modelos prognósticos para pacientes com MFP

Modelo Prognóstico (Referência)	Grupos de risco (pontuação e mediana de sobrevida global) e importância clínica
IPSS (33)	
Fatores de risco (pontuação):	Risco baixo: 0 (11,3 anos)
Idade > 65 anos (1)	Risco intermediário-1: 1 (7,9 anos)
Sintomas constitucionais (1)	Risco intermediário-2: 2 (4 anos)
Hemoglobina < 10 g/dl (1)	Risco alto: ≥ 3 (2,3 anos)
Contagem de leucócitos > 25 x 10 ⁹ /L (1)	O IPSS estima a sobrevida ao diagnóstico
Blastos circulantes ≥ 1% (1)	
DIPSS (40)	
Fatores de risco (pontuação):	Risco baixo: 0 (> 20 anos)
Idade > 65 anos (1)	Risco intermediário-1: 1-2 (14,2 anos)
Sintomas constitucionais (1)	Risco intermediário-2: 3-4 (4 anos)
Hemoglobina < 10 g/dl (2)	Risco alto: 5-6 (1,5 anos)
Contagem de leucócitos > 25 x 10 ⁹ /L (1)	DIPSS estima a sobrevida a qualquer momento do curso da doença
DIPSS-plus (41)	
Fatores de risco (pontuação):	Risco baixo: 0 (15 anos)
Pontuação no DIPSS (DIPSS baixo = 0; DIPSS int-1 = 1; DIPSS int-2 = 2; DIPSS alto = 3)	Risco intermediário-1: 1 (6,6 anos)
Demanda transfusional de hemácias (1)	Risco intermediário-2: 2 (2,9 anos)
Contagem de plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L (1)	Risco alto: ≥ 3 (1,3 anos)
Cariótipo desfavorável* (1)	DIPSS-plus estima a sobrevida a qualquer momento do curso da doença

*(+8, -7/71, i(17)q, -5/5q, 12p-, inv(3), rearranjo 11q23)

IPSS: *International Prognostic Scoring System*; DIPSS: *Dynamic International Prognostic Scoring System*.

Pacientes com risco intermediário-2 e alto risco devem ser considerados para a realização de TACPH e, se inelegíveis, conduzidos conforme acima, de acordo

com os sintomas constitucionais predominantes (38). Finalmente, com relação à prevenção de eventos trombóticos, a decisão terapêutica deve levar em consideração o risco destes e o antecedente ou não de sangramentos: pacientes com < 60 anos, sem fatores de risco cardiovascular, sem mutação *JAK2V617F* e sem leucocitose ou sintomas microvasculares podem ser apenas observados. Pacientes com algum desses fatores, na ausência de sangramentos prévios, devem receber antiagregação plaquetária. Caso o paciente já tenha apresentado um episódio ou tenha elevado risco de sangramentos, a terapêutica citorredutora deve ser priorizada como estratégia de prevenção de trombose, principalmente em pacientes com leucocitose/plaquetose (39).

1.1.2. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

As síndromes mielodisplásicas (SMD) caracterizam-se como uma proliferação clonal de células mieloides, resultando numa hematopoiese ineficaz e displásica. Esse processo leva a um menor número de células circulantes, o que dá origem à sua principal manifestação, as citopenias. A instabilidade clonal relacionada à hematopoiese ineficaz resulta num risco variável de evolução para LMA (42). A incidência anual nos Estados Unidos é de aproximadamente 4 por 100 mil, acometendo principalmente homens com uma mediana de idade na sétima década de vida. Nessa faixa etária, a incidência salta para 40 a 50 por 100 mil (43).

Os sinais e sintomas são geralmente relacionados às citopenias, como fraqueza, palidez e manifestações hemorrágicas. Com frequência, a apresentação costuma ser assintomática e as alterações são identificadas em exames de rotina (44). A maioria dos pacientes (90%) apresenta anemia, sendo a ocorrência de neutropenia ou plaquetopenia isolados muito rara, ocorrendo em cerca de 10% dos pacientes (42). Eventualmente pacientes com SMD podem cursar com doenças autoimunes, como poliartrite, policondrite e vasculites (45).

O diagnóstico depende da detecção de: 1) citopenias; 2) displasia, excesso de blastos ou alterações citogenéticas específicas e 3) exclusão de outros diagnósticos que possam cursar com displasia (46). É neste último elemento que reside a maior dificuldade diagnóstica desta entidade, uma vez que os achados morfológicos sugestivos de displasia não são adequadamente padronizados e muitas vezes são identificados em pacientes saudáveis ou que apresentam patologias benignas como, por exemplo, a deficiência de vitamina B12 (47).

Além desses fatores, o diagnóstico é muitas vezes dificultado pela diversidade de apresentações da doença, fruto dos múltiplos mecanismos etiopatogênicos que serão descritos a seguir. Entre as entidades principais, em virtude da singularidade de sua apresentação clínica ou de seu tratamento, merecem destaque a SMD com sideroblastos em anel e a SMD com deleção isolada do braço longo do cromossomo 5 (5q-) (13). A **TABELA 3** resume a classificação patológica das SMDs e seus critérios principais.

A etiopatogenia está relacionada a diversos fatores, com uma interação entre fatores ambientais (como exposições prévias a quimioterápicos, radioterapia e outros agentes mutagênicos), fatores genéticos e fatores relacionados ao envelhecimento, resultando num cenário genômico complexo, caracterizado por diferentes mutações relacionadas a vias de sinalização intracelular e *splicing* de DNA (48). Uma causa específica, porém, só é conhecida em 15% dos casos, havendo considerável variabilidade de etiologias específicas com a faixa etária (predisposições hereditárias na população pediátrica *versus* exposição quimioterápica na população idosa, por exemplo (42)).

De maneira análoga à MFP, o curso heterogêneo e o risco variável de transformação para LMA, fazem com que a estratégia terapêutica seja dependente da estratificação prognóstica e da presunção de tolerabilidade a tratamentos intensivos pelo paciente. A principal ferramenta para esta estratificação é o *Revised International Prognostic Scoring System* (R-IPSS) (49), resumido na **TABELA 4**

Em pacientes de risco muito baixo, com citopenias que não determinam sintomas, a observação é uma opção terapêutica razoável. Já nos pacientes que apresentam citopenias sintomáticas, os objetivos principais do tratamento são a melhoria das citopenias com a menor carga transfusional possível (e consequentemente menor sobrecarga de ferro, no caso do uso de transfusões de concentrados de hemácias para tratamento da anemia) e a redução do risco de transformação para LMA. No caso do primeiro, os fatores de crescimento, eritropoiético, granulocítico e trombopoietico (nos pacientes com plaquetopenia) são fundamentais (50), concomitante à quelação de ferro nos pacientes com evidências de sobrecarga de ferro, como evidenciado por uma ferritina > 1000 ng/ml, por exemplo (51). No caso de pacientes com del(5q) o uso da lenalidomida está associado a maiores taxas de interrupção da dependência transfusional(52). O luspatercept surgiu recentemente como opção para os pacientes com sideroblastos em anel (53).

TABELA 3 - Classificação OMS 2016 das SMDs

Nome	Linhagens displásicas	Citopenias*	% de sideroblastos em anel ^{&}	Blastos	Citogenética
SMD com displasia unilinhagem	1	1-2	<15%/<5% [^]	MO <5%; SP < 1%, sem bastonetes de Auer	Qualquer, exceto del(5q)
SMD com displasia multilinhagem	2-3	1-3	<15%/<5% [^]	MO <5%; SP < 1%, sem bastonetes de Auer	Qualquer, exceto del(5q)
SMD com sideroblastos em anel (SA)					
SMD-SA e displasia unilinhagem	1	1 ou 2	≥15%/≥5% [^]	MO <5%; SP < 1%, sem bastonetes de Auer	Qualquer, exceto del(5q)
SMD-SA e displasia multilinhagem	2-3	1-3			
SMD com del(5q) isolada	1-3	1-2	qualquer	MO <5%; SP < 1%, sem bastonetes de Auer	del(5q) [%]
SMD com excesso de blastos					
SMD com excesso de blastos-1	0-3	1-3	qualquer	MO: 5-9% ou SP: 2-4%, sem bastonetes de Auer	Qualquer
SMD com excesso de blastos-2	0-3	1-3	qualquer	MO: 10-19% ou SP: 5-19%, ou bastonetes de Auer	Qualquer
SMD, inclassificável					
Com 1% de blastos	1-3	1-3	qualquer		Qualquer
Com displasia unilinhagem e pancitopenia	1	3	qualquer	MO <5%; SP < 1%, sem bastonetes de Auer	Qualquer
Baseado em anormalidade citogenética definidora	0	1-3	<15%		Qualquer
Citopenia refratária da infância	1-3	1-3	Nenhum	MO <5%; SP <2%	Definidora de SMD

*Citopenias definidas como hemoglobina < 10 g/dl; plaquetas < 100 x 10⁹/L e contagem absoluta de neutrófilos < 1.8 x 10⁹/L. [&]% dos elementos eritroides. [^]Se mutação *SF3B1* está presente. %del(5q) sozinha ou com 1 anormalidade adicional, exceto -7 ou del(7q)

TABELA 4 - Escore prognóstico utilizado para pacientes com SMD (R-IPSS)

R-IPSS: Valores do escore prognóstico							
Variáveis prognósticas	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Citogenética	Muito bom		Bom		Intermediário	Pobre	Muito pobre
% de blastos na medula óssea	<=2		>2-<5%		5-10%	>10%	
Hb	=>10		8-<10	<8			
Plaquetas	=>100	50-100	<50				
Neutrófilos	=>0.8	<0.8					
R-IPSS: Grupos de risco citogenético							
Subgrupos de risco citogenético			Anormalidade citogenéticas				
Muito bom			-Y, del(11q)				
Bom			Normal, del(5q), del(12p), del(20q), duplo incluindo del(5q)				
Intermediário			del(7q), +8, +19, i(17q), qualquer outro clone independente duplo ou único				
Pobre			-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duplo, incluindo -7/del(7q), Complexo: 3 anormalidades				
Muito pobre			Complexo: >3 anormalidades				
R-IPSS: Categorias de risco prognóstico							
Categoria de Risco	Escore de risco	Mediana de tempo (em anos) para LMA em 25% dos pacientes			Mediana de tempo (em anos) de sobrevida global		
Muito baixo	≤ 1,5	Não relatado			8,8		
Baixo	> 1,5 - 3	10,8			5,3		
Intermediário	> 3 - 4.5	3,2			3		
Alto	> 4,5 - 6	1,4			1,6		
Muito alto	> 6	0,7			0,8		

R-IPSS: *Revised International Prognostic Scoring System*

Pacientes de risco baixo refratários aos tratamentos supracitados ou pacientes de risco alto apresentam opções terapêuticas mais restritas. Nesse grupo, o objetivo principal é alterar a evolução natural da doença rumo à transformação para LMA. Nesse cenário, o objetivo principal do tratamento é conduzir o paciente ao TACPH (54). O momento de sua realização, porém, permanece em debate, principalmente no caso de pacientes que apresentam excesso de blastos, onde há dúvidas

sobre o benefício de terapia citorredutora (seja com quimioterapia intensiva, de baixas doses) ou de agentes hipometilantes (55) antes do TACPH. Estes últimos permanecem como a conduta padrão para pacientes com SMD de risco alto ou risco baixo refratários inelegíveis para terapias mais intensivas, como o TACPH (56).

1.1.3. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A leucemia mieloide aguda caracteriza-se pela proliferação de células imaturas dessa linhagem, com consequente comprometimento da hematopoiese normal, levando a um quadro de insuficiência medular caracterizado por plaquetopenia e anemia de intensidade moderada a grave, associados à leucopenia com neutropenia ou a leucocitose acentuada, às custas de células imaturas, os blastos (57).

Sua incidência anual é estimada em 3 a 5 casos por 100 mil nos EUA, sendo a leucemia aguda mais comum no adulto, com mediana de idade em torno de 65 anos (58). Clinicamente, a doença apresenta início abrupto, com rápida evolução dos sintomas, representados pelas manifestações decorrentes das citopenias (cansaço, fraqueza e mal-estar resultantes da anemia; sangramentos, secundários à plaquetopenia e febre e infecções, resultantes das neutropenia), além daquelas observadas em decorrência do excesso de leucócitos, como tontura, alteração do nível de consciência e dispneia (59). Eventualmente pode ocorrer a infiltração de tecidos extramedulares, com a formação de tumores, os chamados sarcomas mieloides (60).

Do ponto de vista da fisiopatologia, a leucemia mieloide aguda pode surgir de uma neoplasia hematológica subjacente, como a SMD ou as NMP, como consequência de um tratamento quimioterápico prévio para outra neoplasia ou, como na maioria dos casos, *de novo*, em pacientes previamente saudáveis (61). Esta multiplicidade de etiopatogenias se reflete na sua classificação diagnóstica mais recente (OMS 2016), resumida na **TABELA 5** (13).

Independente da origem, porém, a LMA, de maneira análoga à SMD, está relacionada a um conjunto de alterações genéticas que comprometem o processo de maturação normal dos precursores mieloides, sendo as alterações cromossômicas e as mutações no DNA os principais eventos iniciadores dessa neoplasia (62). Essas mutações abrangem um grande número de processos intracelulares, como *splicing* de DNA, vias de sinalização, fatores de transcrição, metilação do DNA, modificadores de cromatina e genes supressores de tumores, entre outros (63{Papaemmanuil, 2016 #2807, 64).

TABELA 5 - Classificação OMS 2016 da LMA e neoplasias relacionadas

LMA com alterações genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LPA com <i>PML-RARA</i>
LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LMA (megacarioblástica) t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1</i>
LMA com <i>NPM1</i> mutado
LMA com mutações bialélicas de <i>CEBPA</i>
<i>Entidade provisória: LMA com RUNX1 mutado</i>
LMA com alterações relacionados à mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas à terapia
LMA sem outras especificações (SOE)
LMA com diferenciação mínima
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica/monocítica aguda
Leucemia eritroide pura
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Mielofibrose com panmielose aguda
Sarcoma mieloide
Proliferação mieloides relacionadas à síndrome de Down
Mielopoiese transitória anormal (MTA)
Leucemia mieloide associada à síndrome de Down

Essa fisiopatologia baseada em múltiplos eventos citogenéticos e moleculares se reflete na estratificação prognóstica desta patologia, tendo sido descritos

diversos modelos que diferem entre si pelo agrupamento e pelo número de variáveis contempladas (mutações, alterações citogenéticas). A classificação habitualmente mais aceita e utilizada atualmente é a da *European Leukemia Net* (ELN) (65), resumida na **TABELA 6**.

TABELA 6 - Classificação de risco de LMA - ELN 2017

Favorável
t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
<i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3</i> -ITD ou com <i>FLT3</i> -ITD ^{baixo(a)}
<i>CEBPA</i> mutado bialélico
Intermediário
<i>NPM1</i> mutado e <i>FLT3</i> -ITD ^{alto(a)}
<i>NPM1</i> selvagem sem <i>FLT3</i> -ITD ou com <i>FLT3</i> -ITD ^{baixo(a)} (sem alterações citogenéticas de alto risco)
t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i> ^(b)
Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis ou desfavoráveis
Desfavorável
inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM(EVI1)</i>
t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
t(v;11)(v;q23); rearranjo <i>KMT2A</i>
t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
-5 ou del(5q); -7; ane(17p);
cariótipo complexo ^c , cariótipo monossômico ^d
<i>NPM1</i> selvagem com <i>FLT3</i> -ITD ^{alto(a)}
<i>RUNX1</i> mutado ^(e) ; <i>ASXL1</i> mutado ^(e) ou <i>TP53</i> mutado

^aBaixo, carga alélica baixa (< 0,5); alto, carga alélica alta (≥ 0,5);

^bA presença da t(9;11)(p21.3;q23.3) tem precedência sobre alterações citogenéticas de alto risco concorrentes.

^cTrês ou mais alterações cromossômicas na ausência de uma das translocações ou inversões recorrentes, isto é, t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) ou t(3;3); LMA com *BCR-ABL1*

^dDefinido pela presença de uma monossomia (exceto perda do X ou Y) em associação com pelo menos uma monossomia adicional ou alteração cromossômica estrutural (exceto t(8;21)(q22;q22 ou inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)).

^eEssas mutações não devem ser usadas como marcadores de prognóstico desfavorável se elas coocorrerem com subtipos favoráveis de LMA.

Tamanha instabilidade genômica acarreta agressividade e refratariedade às terapêuticas convencionais. A análise da sobrevida de pacientes com LMA permite

a identificação de dois fatores de risco principais: idade e citogenética. A mediana de sobrevida global em indivíduos com menos de 60 anos e risco favorável é de cerca de 63 meses, caindo para 14,6 meses naqueles com mais de 60 anos. Já a mediana de sobrevida global para o risco desfavorável, em indivíduos com menos de 60 anos, é de 6 meses, caindo para 4,8 meses em pacientes com mais de 60 anos (66). Nesse contexto, fica evidente que estes dois fatores são decisivos para a seleção de tratamento.

Pacientes elegíveis para quimioterapia intensiva recebem uma ou duas induções com esquema quimioterápico baseado em antracíclico e citarabina. Alcançada a remissão completa, pacientes de risco intermediário e desfavorável tem indicação de realizar TACPH como terapêutica de consolidação (67). Pacientes sem doador ou com risco favorável vão receber um número variável (2-4) de ciclos de consolidação com citarabina em altas doses ($> 1 \text{ g/m}^2$) (68).

Pacientes inelegíveis apresentavam como opção terapêutica o suporte transfusional ou uso de terapia citorredutora, como a hidroxiureia e a citarabina em baixas doses (69). Nos últimos anos os hipometilantes se tornaram uma opção atraente, porém sem claro benefício em relação aos tratamentos mencionados anteriormente (70).

Mais recentemente, porém, o tratamento da LMA tem apresentado avanços significativos, com a incorporação, nos últimos anos, de novas drogas que tem representado opções terapêuticas eficazes e menos tóxicas para uma população de pacientes que antes não dispunham de um número muito limitado de opções terapêuticas (71).

Tendo como alvo, em sua maioria, alterações epigenéticas ou mutações específicas, esses tratamentos trouxeram, pela primeira vez em mais de 30 anos, ganho de sobrevida global (72). Esses avanços, porém, não se restringem ao arsenal terapêutico; a incorporação de novas tecnologias de monitorização da doença, como a doença residual mensurável (73) tem impactado nas indicações terapêuticas de TACPH, permitindo a seleção mais adequada de pacientes com maior risco de recidiva (74, 75).

1.2. DINÂMICA CLONAL EM NEOPLASIAS MIELOIDES

Conforme destacado anteriormente, as neoplasias mieloides são proliferações clonais de células da linhagem mieloide. O entendimento sobre a dinâmica

desses clones foi bastante limitado até recentemente. Tradicionalmente, acreditava-se que a evolução clonal nessas neoplasias era explicada por uma arquitetura linear, com clones subsequentes incorporando e ampliando mutações de clones precursores (76). Estudos recentes têm rompido com esse modelo tradicional de arquitetura clonal linear, estabelecendo um cenário onde subpopulações de células com capacidade de autorrenovação geram, mantêm e propagam as neoplasias mieloides, através de um padrão de arquitetura clonal ramificada, que evolui a partir de pressões seletivas (77). Esse novo modelo coloca a dinâmica clonal como um fator fisiopatológico e prognóstico fundamental nas neoplasias mieloides, lançando luz nos mecanismos de desenvolvimento, progressão e recidiva dessas neoplasias.

1.2.1. O SEQUENCIAMENTO MASSIVAMENTE PARALELO E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA DINÂMICA CLONAL

O sequenciamento do genoma humano, em 2003, representou um grande salto tecnológico. Além do feito em si e do conhecimento adquirido, o legado deixado com relação às tecnologias de sequenciamento revolucionou nossa capacidade de estudar aspectos genéticos e moleculares de indivíduos sadios e doentes, oferecendo um entendimento único sobre doenças como o câncer e abrindo as portas para a exploração de novos campos relacionados à genômica, como o sequenciamento de RNA e a transcriptômica (78).

A tecnologia de sequenciamento de DNA preponderante desde a década de 1970 e na qual se baseou, em grande parte, o Projeto Genoma Humano, foi desenvolvida por Sanger em 1977 e consistia em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com uma mistura de trifosfatos de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) e trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs). Os primeiros, por não disporem do grupo hidroxil 3', impedem, quando incorporados, o enlogamento da fita de DNA, o que resulta na formação de fitas de DNA com diferentes comprimentos. Inserindo-se ddNTPs contendo somente um dos quatro desoxinucleotídeos (ddATP; ddTTP; ddGTP; ddCTP) em quatro bandas paralelas é possível avaliar a sequência de bases nitrogenadas de uma fita de DNA (79).

O advento de aparelhos capazes de identificar as quatro bases nitrogenadas numa única coluna, através de eletroforese capilar, constituiu a base do sequenciamento do genoma humano e recebeu o nome de sequenciamento de alta produção (*high throughput sequencing*) (80). Esses aparelhos eram capazes de detectar 500-

600 pares de base em cada uma de 96 reações com cerca de 10 horas de duração, gerando uma produção de cerca de 100 mil bases/dia. Como resultado dos avanços tecnológicos alcançados com o Projeto Genoma Humano, uma nova estratégia de sequenciamento foi desenvolvida, que permitiu com que o limite de sequenciamento de 100 mil bases por dia em 2005, chegasse a 100.000 bilhões (10^{14}) em 2010, recebendo a denominação de sequenciamento de próxima geração (NGS) (81).

Embora com especificidades de cada fabricante, o NGS tem como princípio o sequenciamento massivamente paralelo. Substituindo a clonagem do gene em bactérias, e posterior isolamento, como estratégia de amplificação do DNA, no sequenciamento massivamente paralelo o DNA é fragmentado e ligado a DNAs sintéticos adaptadores, desenhados de acordo com a região que se deseja sequenciar, resultando na formação de dezenas a centenas de *amplicons*. Essas bibliotecas de DNA são amplificadas por PCR em uma superfície sólida (vidro) ou líquida (emulsão de água em óleo), resultando em milhares de fragmentos de cada *amplicon*.

Os *amplicons* são sequenciados através da análise de incorporação de bases nitrogenadas emissoras de sinais (fluoróforos ou oscilação iônica) —sequenciamento por síntese — ou através da incorporação de sondas ligadas a um fluoróforo, usando diversas metodologias distintas — sequenciamento por ligação (78).

Entre as abordagens para o sequenciamento por síntese, a terminação cíclica reversível (CRT, em inglês) é que se tornou mais popular. Ela consiste de um método cíclico, baseado em 3 etapas: incorporação de nucleotídeo, imagem por fluorescência e clivagem (82). Na primeira etapa, os 4 nucleotídeos (A, C, T, G) marcados com um fluoróforo são adicionados à reação de PCR. Esses nucleotídeos apresentam uma sequência terminadora, que impede a incorporação de novos nucleotídeos naquele ciclo, mas que é passível de clivagem, com liberação do fluoróforo e da cadeia terminal para a incorporação de novos nucleotídeos (terminadores reversíveis). Feita a leitura do fluoróforo correspondente ao nucleotídeo incorporado, os 4 nucleotídeos são lavados e removidos da reação, a sequência terminadora com o fluoróforo é clivada e uma nova reação se inicia (83). Os sequenciadores da marca Illumina® (San Diego, CA, EUA) utilizam-se desta tecnologia.

Outra abordagem de sequenciamento por síntese é a adição de um único nucleotídeo (SNA, em inglês). Aqui, diferente da CRT, não há reversão da incorporação de nucleotídeos; cada um é incorporado num processo contínuo de alongamento. A incorporação de cada dNTP gera um sinal, que é lido pelo sequenciador

(78). Exemplos dessa técnica incluem o pirosequenciamento e o IonTorrent® (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA), a primeira plataforma de sequenciamento sem um sensor óptico. Ela se baseia em um semicondutor que detecta as oscilações do pH oriundas da liberação de prótons resultantes da incorporação de cada dNTP (84).

Esses avanços, porém, apresentam limitações: a polimerase é uma enzima com eficiência < 100%, e como tal, produz erros de duplicação da fita de DNA. Esses erros são transmitidos para todos os *amplicons*, resultado em erros de sequenciamento que variam de 0,1 a 15% (85). A otimização do processo, que envolve o sequenciamento paralelo de múltiplos fragmentos de DNA, exige que estes não sejam muito longos, resultando em um comprimento de leitura de 35-100 pares de bases no sequenciamento por síntese inferior, por exemplo, à técnica Sanger (85), o que aumenta a chance de erros de leitura decorrentes de pareamento inadequado dos múltiplos fragmentos de DNA.

Apesar dessas limitações, o NGS segue em um aprimoramento contínuo, sendo atualmente possível obter uma produção de 20-50 gigabases/dia, com 0,1-1% de erro, a um custo < US\$100,00/gigabase (78). A difusão dessa metodologia trouxe um grande número de possibilidades de sequenciamentos, como o sequenciamento de genoma inteiro (WGS, em inglês), que consiste do sequenciamento de todas as sequências (codificadoras ou não) do genoma humano, o sequenciamento de exoma inteiro (WES, em inglês), que consiste do sequenciamento de todas as sequências codificantes dispostas em 180 mil éxons pertencentes a cerca de 20 mil genes do genoma humano e o NGS direcionado, que consiste do sequenciamento de sequências específicas do genoma humano.

O uso em larga escala dessas metodologias resultou numa expansão sem precedentes do conhecimento acerca do genoma humano, na saúde e na doença. Até 2015, data do seu término, o Projeto 1000 Genomas havia sequenciado o genoma de 2504 indivíduos, de 26 populações distintas (86). O Projeto Atlas do Genoma do Câncer (TCGA, em inglês) sequenciou, até 2019, mais de 20 mil amostras de tecidos de 33 neoplasias primárias pareadas com tecidos normais, abrangendo 11 mil pacientes (incluindo 200 com LMA (63)) num período de 12 anos, gerando mais de 2,5 *petabytes* de dados (87). Foram os resultados de iniciativas como essas, fruto da adoção em larga escala do NGS, que trouxeram grandes avanços no entendimento de alguns aspectos da dinâmica clonal em neoplasias mieloides.

1.2.2. DINÂMICA CLONAL EM NEOPLASIAS MIELOIDES: PREDISPOSIÇÃO RELACIONADA A MUTAÇÕES GERMINATIVAS

As síndromes de predisposição familiar ao câncer foram descritas pela primeira vez em 1969, quando Li e Fraumeni identificaram famílias com elevada incidência de neoplasias e subsequentemente identificaram mutações germinativas no gene supressor tumoral *p53* como a causa (88). Desde então, cada vez mais mutações têm sido associadas com predisposição genética a neoplasias.

Diferente das mutações identificadas somente no tecido neoplásico (somáticas), as mutações que resultam em predisposição genética a neoplasias são germinativas, afetando todos os órgãos e tecidos do indivíduo, resultando na predisposição a diversos tipos de câncer e na hereditariedade das características fenotípicas associadas a essas mutações.

Com relação às neoplasias mieloides, especificamente, vários genes já foram associados à sua predisposição, muitas vezes manifestando-se com fenótipos sindrômicos com repercussão clínica (89), ou a partir da observação de agrupamentos familiares de pacientes com LMA e SMD sem fenótipo clínico aparente (90).

Dados recentes mostram um aumento de 2x no risco de neoplasias mieloides em parentes de primeiro grau de indivíduos com esses diagnósticos (91) e estimam em até 30% a prevalência de mutações germinativas associadas ao desenvolvimento de neoplasias mieloides em famílias com dois ou mais indivíduos com LMA e/ou SMD (92). Ainda, 10-15% dos casos de LMA considerados *de novo*, em indivíduos com mais de 60 anos, apresentam mutações germinativas predisponentes (93).

A frequência e relevância dessas síndromes de predisposição levou, em 2016, ao reconhecimento, pela Organização Mundial de Saúde, da entidade “Neoplasias mieloides com predisposição germinativa” como uma categoria diagnóstica (13). Dos diversos genes associados à predisposição germinativa para o desenvolvimento de neoplasias mieloides, a OMS reconheceu os seguintes (**TABELA 7**): *RUNX1*, *CEBPA*, *DDX41*, *ANKRD26*, *ETV6*, *GATA2* e os genes envolvidos nas síndromes de falência medular (*DBA*) e nas doenças de telômeros (*TERC* e *TERT*, entre outros). Destas, mutações germinativas no *RUNX1* correspondem a cerca de 10% das mutações germinativas predisponentes a neoplasias mieloides identificadas em pacientes com histórico familiar (94).

TABELA 7 - Classificação OMS 2016 das neoplasias mieloides com predisposição germinativa

Neoplasias mieloides com predisposição germinativa sem uma doença preexistente ou disfunção orgânica
LMA com mutação germinativa de <i>CEBPA</i>
Neoplasias mieloides com mutação germinativa de <i>DDX41</i> *
Neoplasias mieloides com predisposição germinativa e doenças plaquetárias
Neoplasias mieloides com mutação germinativa de <i>RUNX1</i> *
Neoplasias mieloides com mutação germinativa de <i>ANKRD26</i> *
Neoplasias mieloides com mutação germinativa de <i>ETV6</i> *
Neoplasias mieloides com predisposição germinativa e outras disfunções orgânicas
Neoplasias mieloides com mutação germinativa de <i>GATA2</i>
Neoplasias mieloides associadas com síndromes de falências medulares
Neoplasias mieloides associadas com doença da biologia de telômeros
Leucemia mielomonocítica crônica juvenil associada com neutrofibrinose, síndrome de Noonan ou
Doenças síndrome de Noonan-símbles
Neoplasias mieloides associadas à síndrome de Down

*neoplasias linfoides também foram relatadas.

O *RUNX1* é um fator de transcrição fundamental para a hematopoiese (95). Sua importância nesse contexto pode ser verificada pela frequência do seu envolvimento em translocações recorrentes e de mutações somáticas nesse gene relacionados a LMA e SMD (96, 97). O fenótipo de plaquetopenia com predisposição familiar a neoplasias mieloides relacionado a mutações germinativas, porém, foi descrito em 1999, por Song *et al.* Eles observaram a presença de mutações em heterozigose em 6 famílias com esse fenótipo em um padrão de herança autossômico dominante (98). Atualmente, já foram descritas mais de 50 variantes do *RUNX1* relacionadas a este fenótipo, a maioria delas acometendo o domínio de homologia ao *Runt*, sem correlação entre o tipo de mutação e a gravidade da plaquetopenia ou o risco de evolução para LMA (99).

A plaquetopenia é leve a moderada na maioria dos indivíduos e se inicia na infância, não se observando alteração do tamanho plaquetário (100). O mecanismo etiológico mais aceito é a maturação anormal do megacariócito, com poliploidização e prejuízo da formação de pró-plaquetas (101). A dismegacariopoiese é um achado universal nas biópsias de medula óssea, independente da evolução para neoplasias mieloides. Outras alterações incluem hipocelularidade, hipo ou hiperplasia de megacariócitos e eosinofilia (102). Importante observar, porém, que a plaquetopenia não é um achado universal nos portadores de mutações germinativas deste gene (103).

Mesmo na ausência de redução grave na contagem das plaquetas, observa-se uma tendência a um fenótipo hemorrágico leve pela presença de defeitos funcionais da plaqueta, relacionados principalmente à deficiência do reservatório de grânulos densos, simulando um efeito semelhante ao da aspirina (104).

O risco de evolução para neoplasias mieloides é de cerca de 50% (99), sendo o risco de evolução para hematopoiese clonal de até 80% (92). Não há, porém, correlação entre o risco de neoplasias mieloides e características clínicas, como idade, alterações medulares e gravidade da plaquetopenia, sendo a penetrância muito variável e os mecanismos de transformação para LMA/SMD incertos (90, 92).

Nesse sentido, vários trabalhos que fazem uso de NGS para caracterizar geneticamente os portadores de mutações germinativas em *RUNX1* que desenvolveram neoplasias mieloides foram publicados recentemente. No maior deles, Antony-Debré *et al.* (105) sequenciaram 11 indivíduos de famílias portadoras de mutação no gene *RUNX1* diagnosticados com LMA/SMD, encontrando, em todos eles, perda do alelo *RUNX1* funcional, atribuindo a este fato o mecanismo de transformação para neoplasias mieloides. Por outro lado, Yoshimi *et al.* identificaram mutações no gene *CDC25C* (que codifica uma proteína relacionada à progressão do ciclo celular) em 4 de 6 pacientes de famílias portadoras de mutações germinativas no *RUNX1* que desenvolveram LMA/SMD (106). Não foram encontradas anomalias no alelo *RUNX1* funcionante de nenhum desses pacientes.

Observa-se, portanto, a falta de consenso sobre a dinâmica clonal através da qual pacientes com mutações que predisõem a neoplasias mieloides desenvolvem essas doenças. A elucidação desta dinâmica, dificultada pelo subdiagnóstico das mutações germinativas em *RUNX1*, poderia, no futuro, resultar na prevenção ou no tratamento precoce dessas doenças (107, 108).

1.2.3. A DINÂMICA CLONAL EM NEOPLASIAS MIELOIDES: CLONALIDADE ENDOTELIAL E FISIOPATOLOGIA DA TROMBOSE EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS *BCR-ABL1* NEGATIVAS

Como citado anteriormente, as NMP *BCR-ABL1* negativas estão associadas com elevado risco de trombose. A incidência deste evento em NMP varia de cerca de 5% na MFP a 10-20% na PV e na TE, sendo a principal causa de óbito em 5-30% dos portadores destas patologias (34, 109, 110).

Vários fatores estão relacionados ao maior risco de trombose, como o hematócrito elevado na PV (111, 112), a elevação na contagem de leucócitos (25, 113, 114); a mutação *JAK2V617F* na TE e na MFP (115, 116) e alterações funcionais de células da linhagem mieloide envolvidas na fisiopatologia da trombose, como os leucócitos, plaquetas e eritrócitos, principalmente quando expressando a mutação *JAK2V617F* (117-119).

Outro elemento celular fundamental na fisiopatologia da trombose é a célula endotelial. Sua disfunção em pacientes com NMP já foi documentada (120, 121), porém a elucidação dos mecanismos pelos quais isso acontece e sua relação com a *JAK2V617F* constituem um desafio abordado por alguns grupos, com limitações.

A dificuldade no estudo funcional das CEs numa doença hematopoiética clonal reside em vários pontos. Primeiramente, tem-se a dificuldade de obtenção e expansão dessas células *ex-vivo*. Considerando-se o caráter somático das mutações envolvidas nessa doença clonal, as CEs a serem isoladas deve ser capaz de vasculogênese pós natal ou oriundas dela, uma vez que as CEs resultantes da vasculogênese pré-natal não expressarão qualquer mutação somática (122). Essa dificuldade fez com que, historicamente, o modelo experimental de escolha para o estudo da disfunção endotelial em NMP fosse o uso de células endoteliais primárias, como as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) com expressão induzida de *JAK2V617F* ou modelos animais de endotélio (principalmente em camundongos) expressores desta mutação (123-125).

Etheridge *et al.* por exemplo, utilizando-se de um modelo animal de expressão de *JAK2V617F* restrito às células endoteliais através do uso de camundongos transgênicos expressando *JAK2V617F* transplantados com células-tronco hematopoiéticas sem expressão desta mutação, observaram um tempo de oclusão significativamente maior após lesão carotídea do que em camundongos selvagens (124). Mais recentemente, Guy *et al.* utilizaram um modelo *in vitro* de células endoteliais humanas

hiperexpressoras de *JAK2V617F* e outro modelo *in vivo* de camundongos com expressão endotelial desta mutação, observando um fenótipo pró-adensivo associado com aumento da exposição endotelial de P-selectina (123).

A segunda questão que dificulta os estudos funcionais das células endoteliais no cenário de uma doença hematopoiética clonal é a dúvida em relação a ontogenia dessas células. Novamente, sendo as NMP doenças clonais adquiridas, a expressão da mutação *JAK2V617F* nas células endoteliais depende da existência de vasculogênese pós-natal e, sendo as NMP neoplasias hematopoiéticas e *a priori* incapazes de promoverem vasculogênese pós-natal, a expressão da mutação *JAK2V617F* em células endoteliais de portadores de NMP depende de alguma relação entre a ontogenia das células endoteliais e das células hematopoiéticas (126). Conforme exemplificado na **FIGURA 1**, existem três modelos principais da ontogenia das células endoteliais e de sua relação com as células hematopoiéticas (127).

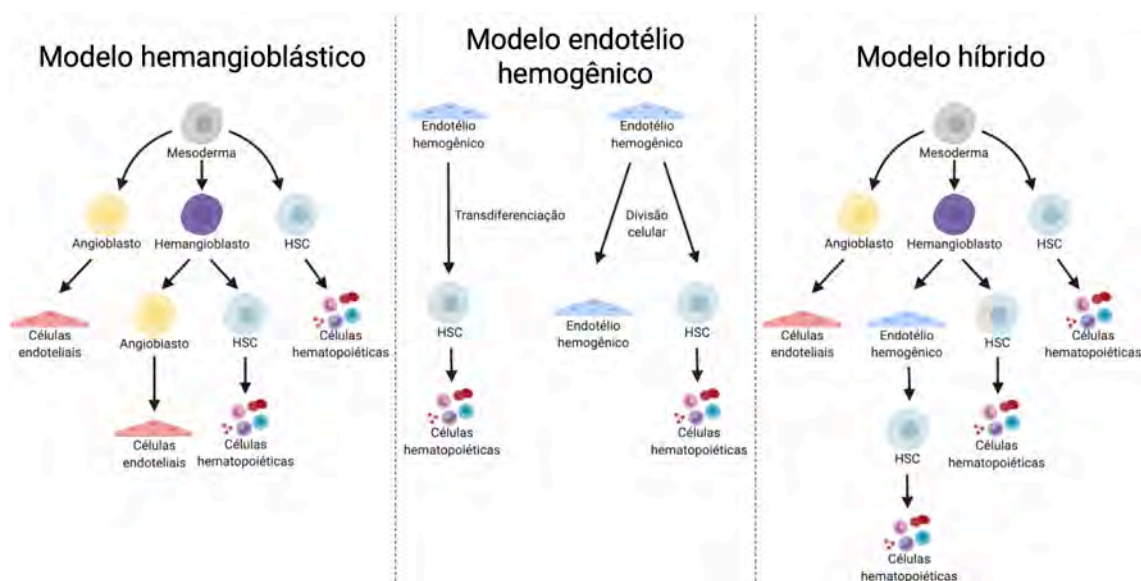


FIGURA 1 - Ontogenia e possíveis relações das células endoteliais e hematopoiéticas (Adaptado de Bautch VL (127)).

No modelo hemangioblástico, a célula-tronco hematopoiética e o angioblasto (a célula precursora das CEs) compartilham um precursor comum, o hemangioblasto. No modelo do endotélio hemogênico (embrionário), por sua vez, o endotélio se transdiferencia em célula tronco-hematopoiéticas, mantendo uma progênia de CEs. Finalmente, no modelo híbrido, temos a coexistência dos dois mecanismos.

Combinando-se as teorias sobre a ontogenia das CEs com a possível expressão endotelial de *JAK2V617F*, tem-se a conclusão lógica de que, se ela de fato ocorre, então a célula-tronco neoplásica das NMP é o hemangioblasto, uma vez que

esta seria a única maneira do endotélio adulto expressar tal mutação. A investigação dessa questão, porém, depende da capacidade de se isolar uma célula verdadeiramente endotelial do adulto, dado que células como a HUVEC, pela sua origem, nunca expressariam espontaneamente *JAK2V617F*, e que células mieloides, derivadas de monócitos, podem, em certas condições, apresentar fenótipo e comportamento funcional de células endoteliais (128).

Classicamente, foram descritos dois tipos de CE circulantes: um de origem mieloide, oriundo da diferenciação monocítica e sem potencial proliferativo (por isso não formador de colônia) e portanto incapaz de vasculogênese pós-natal, mas iniciador deste processo, pela capacidade de sinalização parácrina com recrutamento de células endoteliais verdadeiras (122, 129); e outro, de natureza endotelial, sem indícios de derivação mieloide, e por isso $CD45^-$, com alta capacidade proliferativa, gerando múltiplas colônias, e por isso capaz de vasculogênese pós-natal (130, 131). A **TABELA 8** resume as diversas nomenclaturas utilizadas para os dois tipos de precursores, bem como suas características principais. A **FIGURA 2** descreve as diferentes técnicas para o isolamento dos dois tipos de células.

Nessa linha de investigação, Yoder *et al.* realizaram o isolamento de MACs e ECFCs de pacientes com PV, identificando, como esperado, a mutação em 541/541 colônias de MAC isoladas de 11 pacientes. Entretanto, *JAK2V617F* foi detectado em somente em 3 de 89 colônias de ECFCs recuperadas do sangue periférico de 11 pacientes portadores de PV. As três colônias pertenciam ao mesmo paciente, que tinha antecedente de tromboembolismo venoso. Na discussão de seus achados, os autores postularam que as 3 colônias de ECFCs *JAK2V617F*⁺ poderiam corresponder à contaminação por célula mieloides, e que provavelmente as CEs e as células hematopoiéticas não compartilhariam uma origem comum (128). Posteriormente, Piaggio *et al.* foram incapazes de detectar a presença dessa mutação em 226 colônias de ECFCs recuperadas do sangue periférico de 76 pacientes com NMP (incluindo Leucemia Mieloide Crônica), dos quais 57 tinham mutação *JAK2V617F*, apesar da identificação desta mutação em 44/44 colônias de MAC (132), reforçando os achados anteriores. Não há, entretanto, descrição de pacientes com trombose nessa coorte.

TABELA 8 - Características dos diferentes precursores endoteliais circulantes

Linhagem hematopoiética				Linhagem endotelial			
Nomenclatura (na primeira linha, a recomendada atualmente (133, 134), abaixo outros termos usados na literatura)							
Células mieloides angiogênicas (MAC)				Células formadoras de colônias endoteliais (ECFCs)			
Células angiogênicas circulantes (CAC)				Células endoteliais sanguíneas de crescimento tardio (BOECs)			
Unidade formadora de colônia Hill (CFU-Hill)				Célula endotelial progenitora tardia (EPC tardia)			
Células endotelial progenitora precoce (EPC precoce)							
Fenótipo							
CD34 ^{+/-}	CD133 ⁺	CD45 ⁺	CD146 ⁻	CD34 ^{+/-}	CD133 ⁻	CD45 ⁻	CD146 ⁺
KDR ⁺	CD14 ⁺	CD105 ^{+/-}		KDR ⁺	CD14 ⁻	CD105 ⁺	
Características funcionais							
Sem capacidade de formação de colônias no replaqueamento				Grande capacidade de formação de colônias no replaqueamento			
Sem capacidade de neovasculogênese				Neovasculogênese <i>in vitro</i>			
Alta capacidade de ampliação parácrina da angiogênese				Alta capacidade de ampliação parácrina da angiogênese			

Em paralelo, o grupo de Sozer utilizou microdissecção a laser no produto de esplenectomias terapêuticas em 3 pacientes com PV para extração de células endoteliais. Identificou *JAK2V617F* nas células endoteliais dos 2/3 pacientes com trombose. Finalmente, Teofili *et al.* foram capazes de identificar a mutação *JAK2 V617F* em ECFCs isoladas de sangue periférico somente daqueles pacientes portadores de NMP *JAK2V617F*⁺ que tinham antecedente de evento tromboembólico (4/17 pacientes) (135).

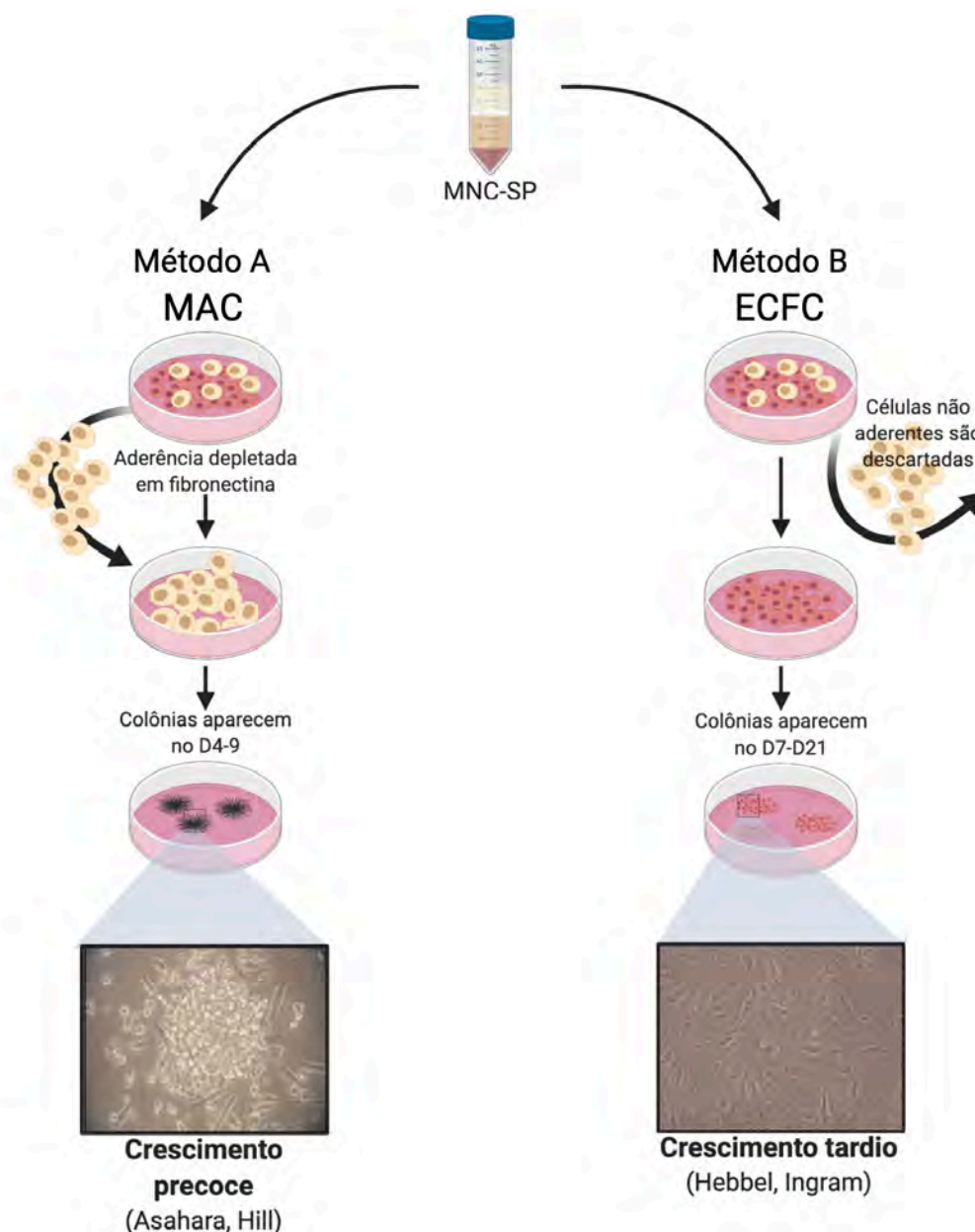


FIGURA 2 - Estratégias de cultura para obtenção de precusores endoteliais. No método A, células mononucleares (MNC-SP) são obtidas do sangue periférico e cultivadas em meio específico. As células não aderentes são transferidas para outra placa com o mesmo meio de cultura e rapidamente tem-se o crescimento de células de fenótipo endotelial (células mieloides angiogênicas – MAC). No método B, células mononucleares são cultivadas em meio específico. As células não aderidas são descartadas e cerca de 14-21 dias depois, surgem células de fenótipo endotelial e morfologia específicas (ECFCs - células formadoras de colônias endoteliais). Adaptado de Prater *et al.* (136).

Rosti *et al.* abordaram o problema com uma estratégia diferente: isolaram ECFCs do baço e extraíram células endoteliais de capilares e veias esplênicas através de microdissecção a laser, bem como células endoteliais esplênicas por citometria de fluxo, de pacientes submetidos à esplenectomia. Eles identificaram a mutação

JAK2V617F em CEs da veia esplênica de 1/6 pacientes, nas CEs de capilares esplênicos de 8/8 pacientes, nas CEs esplênicas de 6/10 pacientes, mas não em ECFCs esplênicas (137). Nenhum dos pacientes desta coorte tinha antecedente de trombose.

Embora os achados anteriormente descritos permitam concluir que existe expressão endotelial da mutação *JAK2V617F*, eles sugerem outros questionamentos sobre os modelos experimentais e o papel do endotélio *JAK2V617F* na trombose em NMP. No trabalho de Rosti *et al.*, pacientes que expressavam *JAK2V617F* em uma topografia (capilares esplênicos, por exemplo), não expressavam em outra (veias esplênicas), sugerindo uma heterogeneidade dessa expressão dentro do sistema vascular. Ainda, apesar dessa expressão endotelial de *JAK2V617F*, nenhum dos pacientes da casuística de Rosti *et al.* tinha antecedente de trombose, o que traz questionamentos acerca do papel do endotélio mutado na etiopatogênese deste fenômeno. Por fim, a ausência de *JAK2V617F* em ECFCs esplênicas de pacientes com expressão dessa mutação em outras CEs oriundas do baço sugere que a expressão endotelial de *JAK2V617F* não é resultante da vasculogênese mediada por ECFCs, embora as publicações envolvendo a análise da mutação *JAK2V617F* em ECFCs de pacientes com antecedente de trombose tenham mostrando a presença dessa mutação nessas células (126, 128, 138).

A análise do conjunto desses achados impõe a necessidade da elucidação da expressão de *JAK2V617F* em ECFCs (células endoteliais progenitoras capazes de vasculogênese pós-natal), de sua relação clonal com precursores hematopoiéticos das NMP e seu impacto funcional em CEs autólogas. Sendo a mutação *JAK2V617F* um dos principais fatores de risco para ocorrência de trombose em NMP e uma vez que a expressão dessa mutação no endotélio se mostrou heterogenia (descrito acima), mecanismos de alteração da função endotelial mediados por *JAK2V617F*, mas independentes da expressão endotelial deste, devem ser estudados.

1.2.4. DINÂMICA CLONAL EM NEOPLASIAS MIELOIDES: IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM PACIENTES COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL *BCR-ABL1* NEGATIVA SEM MUTAÇÕES EM GENES CLÁSSICOS

A natureza clonal das NMP *BCR-ABL1* negativas é conhecida desde 1976, quando foi descrito o achado de homozigose *A/A* no *locus* gênico da glicose-6-fosfato desidrogenase a partir do sequenciamento de DNA oriundo de leucócitos de duas

mulheres com PV, em comparação com a heterozigose A/B observada no DNA extraído de células não afetadas pela doença, como fibroblastos (139).

Foi somente em 2005, porém, que a mutação *JAK2V617F* foi descrita, em associação com 97% dos casos de PV e 50-60% dos casos de TE e MFP (140). Posteriormente, houve a identificação de uma mutação de ponto no gene *MPLW515K/L*, que pela sua baixa frequência, permitiu a caracterização adicional de somente 5-10% dos pacientes com MFP e TE (141).

O uso do NGS representou um grande passo na caracterização molecular dos 35-40% de pacientes com NMP sem mutações no *MPL* e *JAK2*, a medida que levou a identificação de mutações em *CALR* (11) presentes em 25-35% dos pacientes com MFP e TE. Localizadas no éxon 9, as mutações da *CALR* se dividem em dois grupos: uma deleção de 52 pares de base; c.1092_1143del (denominada mutação do tipo I) e um inserção de 5 pares de base; c.1154_1155insTTGTC (denominada mutação do tipo II) (142)

Essas três mutações são promotoras de NMP, no que são capazes de, isoladamente, levar ao desenvolvimento dessas patologias, tendo como via comum a ativação da via de sinalização JAK/STAT, quer seja pela mutação do próprio gene *JAK2*, no caso de *JAK2V617F*, seja pela ativação do *MPL* pelas mutações no respectivo gene ou pela alteração do seu posicionamento celular mediado pela *CALR* mutada (143, 144).

Se por um lado, em conjunto, as mutações nos 3 genes permitem a definição de clonalidade em 85-95% dos casos de NMP, por outro restam 10-15% dos pacientes com MFP e TE que não apresentam mutações em nenhum dos três genes clássicos, os chamados triplo negativos (TN).

No caso da MFP, o status TN apresenta consequências clínicas evidentes: esses pacientes apresentam mais anemia e menores contagens de plaquetas, além de uma menor tendência à trombose (115, 145, 146). Além disso, observa-se um grande impacto no risco de transformação para leucemia aguda e na sobrevida global: a incidência de transformação para leucemia aguda é de 25%, comparado com 6,5% em pacientes com mutações em *CALR*; com relação à sobrevida global, a mediana é de 16 anos para pacientes com mutações em *CALR*, comparado com 2,3 anos para pacientes TN.

O uso mais amplo do NGS em MFP, porém, levou a identificação de mutações em genes não condutores (i.e. *non-driver*), como *EZH2*; *ASXL1*, *SRSF2* e *IDH1/2*

cuja presença afeta negativamente o prognóstico de maneira independente (147). Isso levou ao desenvolvimento de modelos prognósticos integrando a informação a respeito do status de mutações nesses genes (genes acometidos e número de mutações) e em *CALR* a variáveis clínicas, com capacidade de predição de sobrevida global independente do status das demais mutações condutoras (*JAK2/MPL*). Modelos como GIPSS (148), MIPSS70 (149) e MIPSS70+ (150) reforçam como a ocorrência de mutações não condutoras, mesmo em pacientes TN, apresentam impacto prognóstico independente em MFP. Neste sentido, o uso clínico rotineiro de NGS em pacientes com MFP parece justificado pela elevada capacidade prognóstica e prevalência das mutações desses genes de alto risco nessa coorte (30-40%) (149).

Na TE, porém, o impacto do status TN, ou mesmo de mutações adicionais, é incerto. No mesmo trabalho da coorte da clínica Mayo que mostrou o impacto do status TN na MFP, não se evidenciou diferença na sobrevida global de TE TN, não havendo características clínicas específicas da TE TN em relação às outras mutações (145).

De maneira semelhante, o uso de NGS na caracterização molecular de TE TN, ou mesmo na identificação de mutações não condutoras associadas a um pior prognóstico, apresentou resultados contraditórios. Asp *et al.* observaram uma redução de sobrevida global associada à presença de mutações nos genes *SRSF2* e *ASXL1* em pacientes com TE (151). Esses achados, porém, são de difícil generalização, dado que apenas 3 pacientes apresentavam mutações em *SRSF2* (dos 51 pacientes com TE) e 7 apresentavam mutações em *ASXL1*. Curiosamente, 4/12 pacientes com TE supostamente TN, tiveram mutações no gene *MPL* identificadas após o uso de NGS. Paz *et al.* aplicaram NGS a 190 casos consecutivos de TE, dos quais 43 eram TN. Eles observaram um impacto da presença de mutações adicionais, independente de seu potencial patogênico, na sobrevida global de pacientes com TE. Apesar disso, a estratificação genética não se mostrou superior à estratificação baseada em fatores clínicos, conforme recomendado pela *European Leukemia Net* (28). Finalmente, Tefferi *et al.* aplicaram NGS a uma coorte de 183 pacientes com TE, com uma mediana de sobrevida global de 19,9 anos (152). Eles identificaram um subgrupo de 31 pacientes com mutações adicionais (*ASXL1*, *SRSF2*, *IDH2*), independente do status TN, associadas a uma pior sobrevida: o grupo com essas mutações apresentou uma mediana de sobrevida global de 18,4 meses, enquanto o grupo sem essas mutações apresentou uma mediana de 29 anos. Embora o impacto na sobrevida de mutações

de alto risco, neste trabalho, tenha sido significativo, deve-se observar que sua magnitude foi pequena: 1,5 anos menor do que a sobrevida da mediana da coorte (ou uma redução de 7% na sobrevida). A relevância clínica desta redução, considerando-se o curso indolente desta doença, é questionável.

Na mesma linha, Grinfeld *et al.* usaram NGS numa coorte de 1321 pacientes com TE, dos quais 211 eram TN e encontraram achados semelhantes aos do grupo da Clínica Mayo com relação ao impacto prognóstico: mutações em genes modificadores de cromatina e de fatores de *splicing* foram associados a pior prognóstico, embora o impacto tenha sido pequeno em relação à mediana de sobrevida global de pacientes não selecionados (10).

Curiosamente, porém, esses autores identificaram variantes não canônicas em *JAK2* e *MPL* em 16 TE TN (aprox. 10%), a maioria em *MPL*, sendo a mais frequente a mutação S204P, anteriormente descrita pelos grupos de Cabagnols e Milosevic Feenstra em pacientes TN com frequência de cerca de 10% e com evidências *in vitro* de maior sensibilidade à trombopoetina e portanto possivelmente indutoras de um fenótipo mieloproliferativo (153, 154).

Em resumo, o benefício de uma caracterização clonal mais ampla de pacientes com TE, principalmente TN, apresenta resultados contraditórios: se há um impacto prognóstico, esse parece ser pequeno, já com relação ao impacto no diagnóstico, as principais mutações identificadas nesse grupo parecem ser mutações não canônicas em genes condutores clássicos. Esses resultados apontam para necessidade da revisão do uso de NGS neste cenário.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar, através do uso de sequenciamento massivamente paralelo, o papel da dinâmica clonal na fisiopatologia das neoplasias mieloides.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o impacto da aquisição de mutações somáticas no desenvolvimento e progressão de neoplasias mieloides em pacientes portadores de plaquetopenia hereditária relacionada a mutações germinativas do *RUNX1*;

- b) Avaliar a presença da mutação *JAK2V617F* nas células endoteliais formadoras de colônia de portadores de neoplasias mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas e seu impacto na função destas;
- c) Avaliar a presença de mutações relacionadas a neoplasias mieloides em pacientes com trombocitemia essencial negativa para as mutações dos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR*, bem como a utilidade diagnóstica do uso do sequenciamento massivamente paralelo numa coorte destes pacientes.

3. METODOLOGIA

Com o objetivo de organizar melhor a execução de cada objetivo, os mesmos foram fragmentados em 3 subprojetos distintos. Abaixo, serão descritos os métodos comuns aos 3 e quando pertinente, será apontado quando um método pertencer a um subprojeto específico.

3.1. CASUÍSTICA

3.1.1. SUBPROJETO 1 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA AQUISIÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS NO DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DE NEOPLASIAS MIELOIDES EM PACIENTES PORTADORES DE PLAQUETOPENIA HEREDITÁRIA RELACIONADA A MUTAÇÕES GERMINATIVAS DO *RUNX1*

Foram selecionados 5 pacientes de duas famílias distintas com plaquetopenia hereditária relacionada a mutações germinativas do *RUNX1* (*RUNX1* FPD) que desenvolveram LMA ou SMD e acompanhavam em nosso serviço no período entre 2000 e 2014. Destes pacientes, três dispunham de amostras de DNA da medula óssea e do sangue periférico coletados no diagnóstico da transformação para LMA/SMD e ao longo do tratamento, além de *swab* oral coletado anteriormente ao diagnóstico da transformação. Esses pacientes tiveram o DNA sequenciado conforme será descrito.

3.1.2. SUBPROJETO 2 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DA MUTAÇÃO *JAK2V617F* NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS FORMADORAS DE COLÔNIA DE PORTADORES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS *BCR-ABL1* NEGATIVAS E SEU IMPACTO NA FUNÇÃO DESTAS

Foram selecionados 20 pacientes com NMP *BCR-ABL1* negativas, positivos para mutação *JAK2V617F*, diagnosticados e acompanhados em nosso serviço, para isolamento de ECFCs (coorte ECFC) no período entre janeiro de 2014 e julho de 2019. Os pacientes foram selecionados independente do tempo do diagnóstico, do

uso atual ou pregresso de terapia citorrredutora e do antecedente de trombose. Pacientes com uso atual ou pregresso de inibidores do JAK2 ou participando de estudos clínicos foram excluídos. Em paralelo, foram selecionados 14 indivíduos sadios para isolamento de ECFCs para uso como controles nos experimentos envolvendo essas células.

Posteriormente, foram selecionados 91 pacientes com NMP *BCR-ABL1* negativas (coorte de expansão), para determinação dos níveis plasmáticos de citocinas, proteínas de coagulação e moléculas de adesão. Estes pacientes foram selecionados a despeito do tempo do diagnóstico, presença da mutação *JAK2V617F* uso prévio ou atual de terapia citorrredutora e antecedente de trombose. Adicionalmente, foi coletado plasma de 37 indivíduos sadios para uso como controle nos experimentos envolvendo plasma. Pacientes em uso atual ou prévio de inibidores de JAK2 ou participando de estudos clínicos foram excluídos.

3.1.3. SUBPROJETO 3 - AVALIAR A PRESENÇA DE MUTAÇÕES RELACIONADAS A NEOPLASIAS MIELOIDES EM PACIENTES COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL NEGATIVA PARA AS MUTAÇÕES DOS GENES *JAK2*, *MPL* E *CALR*, BEM COMO A UTILIDADE DIAGNÓSTICA DO USO DO SEQUENCIAMENTO MASSIVAMENTE PARALELO NUMA COORTE DESTES PACIENTES

Foram selecionados 21 pacientes portadores de TE (de uma coorte de 145 pacientes), com diagnóstico entre janeiro de 2007 e dezembro de 2016, negativos para a pesquisa das mutações *JAK2V617F*, *MPLW515L/K* e *CALR* tipo I e II realizadas por PCR por análise de fragmento e com disponibilidade de DNA extraído de leucócitos de sangue periférico ou medula óssea no momento do diagnóstico.

Todos os subprojetos foram desenhados e conduzidos de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki, tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética local. Os indivíduos selecionados para o estudo foram informados sobre os objetivos e métodos da pesquisa, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica. Em caso de concordância com a participação, o consentimento dos participantes foi obtido por escrito.

3.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE LEUCÓCITOS, ECFCs E DE CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA ORAL

Para a extração de DNA genômico de leucócitos, foram coletados 10 ml de sangue periférico em tubo contendo o anticoagulante EDTA 10%. Neste método as

amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1383 *g* para a separação das células. O plasma foi descartado e ao tubo foi adicionado uma mistura de cloreto de amônio (0,144 M) e bicarbonato de amônio (0,01 M) 5 vezes o volume de células, transferido para um tubo de 50 ml para lise de hemácias. As amostras foram misturadas várias vezes por inversão e centrifugadas por 20 minutos a 1016 *g*. Após a centrifugação, um *pellet* foi formado, o sobrenadante descartado, sendo esse procedimento realizado novamente para eliminação das hemácias.

No tubo contendo o *pellet* de células, foi adicionado 5 ml de tampão TKM1 (10 mM de Triz-HCl pH 7,6; 10 mM de KCl; 10 mM de MgCl₂; 20mM de EDTA (ácido metileno diaminotetracético) e 4 gotas de triton para complementar a lise de hemácias. Os tubos foram misturados várias vezes por inversão até a completa dissolução do triton e centrifugados por 15 minutos a 547 *g* à temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e 1000µl do tampão TKM1 foi adicionado ao *pellet* de células para a res-suspensão e transferência para um tubo de 1500 µl. Os tubos foram centrifugados a 12,4 *g* por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi armazenado a -20°C para posterior realização da extração de DNA.

Para a extração do DNA de ECFCs após a sua caracterização por citometria de fluxo, um tubo de células foi descongelado, centrifugado por 5 minutos a 6.450 *g*, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de células formado, foi adicionado uma solução tampão PBS (8 g de NaCl, 2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ e 2,4 g de KH₂PO₄ q. s. p. para 1 litro de solução) para lavar as células e em seguida submeter à extração do DNA.

Para a extração do DNA de leucócitos e das ECFCs em cultura, foram adicionados 800 µl de tampão TKM2 (10 mM de Trizma-HCl, pH 7,6; 10 mM de KCl; 10 mM de MgCl₂; 20 mM de EDTA; 0,4 M de NaCl) e 50 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio a 10%) ao *pellet* de células, as amostras foram misturadas e incubadas a 50°C por 30 minutos, para a lise celular e liberação da molécula de DNA. Após esse período de incubação, foram adicionados 400 µl de NaCl 5M, para remover as proteínas por precipitação salina, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12,4 *g* por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo e isolado por precipitação com 1000 µl de etanol absoluto gelado. Os tubos foram centrifugados para a molécula de DNA se prender no fundo e o sobrenadante descartado, foram adicionados 1000 µl de etanol 70% gelado para hidratar o DNA, os tubos foram centrifugados novamente a 12,4 *g* por 5

minutos e o sobrenadante descartado. Os tubos contendo o DNA precipitado foram mantidos abertos para total evaporação do álcool residual, em seguida foi adicionado 100 µl - 200 µl de água estéril e armazenado na geladeira para eluição da amostra.

Para a extração de DNA de saliva, as células epiteliais da mucosa oral foram coletadas utilizando o kit Oragene® DNA Kit (DNA Genotek, Ottawa, Canada). Após a obtenção da saliva, 500 µl do volume de saliva e solução, foram transferidos para tubos de 1.500 µl e incubados em banho maria a 50°C por 12-16 horas. No dia seguinte foram adicionados 20 µl do reagente purificador prepIT – L2P, misturados no vórtex por alguns segundos e incubados novamente em banho de gelo por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.4 g em temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo adicionados 1000 µl de etanol absoluto para a precipitação do DNA, o *pellet* foi descartado. Os tubos contendo o DNA foram incubados no freezer -20°C por 16 horas ou 1 a 2 horas no freezer -80°C. Após esse período foram centrifugados por 20 minutos a 12.4 g, o sobrenadante descartado, sendo adicionados 1000 µl de etanol 70% gelado, os tubos foram misturados e incubados a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugados novamente. Os tubos contendo o DNA precipitado foram mantidos abertos para total evaporação do álcool residual, em seguida foram adicionados 100µl - 200 µl de água estéril e armazenados a 4°C para a eluição das amostras.

3.3. GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO JAK2V617F POR PCR TEMPO REAL

Para a genotipagem da mutação JAK2V617F, foi utilizado o equipamento 7500 Fast Real-time PCR System Software com Sistema TaqMan® qPCR SNP TaqMan (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA), esse sistema utiliza uma sonda fluorescente marcada com fluoróforos VIC (a referência) e FAM (a alteração) (**TABELA 9**), que possibilita a detecção de um produto específico da PCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação.

As amostras de DNA foram quantificadas no equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) por leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm e diluídas para uma concentração final de 50 ng/µl. Para a reação foram utilizados 50 ng de DNA, 2,5 µl de Universal PCR Master Mix, 0,25 µl da sonda diluída 20x e água estéril para um volume final de 5 µl, pipetados em placa de 96 poços e submetidos a 40 ciclos nas condições de desnaturação 95°C por 15 segundos, anelamento/extensão 60°C por 1 minuto.

TABELA 9 - Ensaio Taqman para a mutação *JAK2V617F*

Gene	Sequência [VIC/FAM]
<i>JAK2</i>	TTTGGTTTTAAATTATGGAGTATGT[G/T]TCTGTGGAGA- CGAGAGTAAGTAAAA

3.4. GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO *JAK2V617F* POR PCR POR RESTRIÇÃO DE FRAGMENTO

Para a genotipagem da mutação *JAK2V617F* por PCR por restrição de fragmento foi utilizado equipamento Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific®, Carlsbad, CA, EUA) com oligonucleotídeos marcados com os fluoróforos FAM (*forward*), HEX (*reverse*), e VIC (controle interno da reação) (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA) (**TABELA 10**) desenhados de maneira que, a amplificação do gene selvagem resulte num único produto de 362 pares de base e que a amplificação do gene mutado leve a um produto de 362 pares de base e outro de 202 pares de base, conforme estabelecido por eletroforese capilar.

As amostras de DNA foram quantificadas no equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) por leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm e diluídas para uma concentração final de 100 ng/μl. Para a reação foram utilizados 100 ng de DNA, 4 μl de Universal PCR Master Mix, 0,16 μl da sonda diluída 20x e água estéril para um volume final de 50 μl, pipetados em placa de 96 poços e submetidos a 37 ciclos nas condições de desnaturação 94°C por 5 minutos, anelamento/extensão 56°C por 20 segundos e 72°C por mais 20 segundos.

TABELA 10 - *Primers* utilizados para ensaio de PCR para *JAK2V617F* por análise de fragmentos

Gene	<i>Forward</i> (FAM)
<i>JAK2</i>	5' AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT-3'
	<i>Reverse</i> (HEX)
	5' CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA 3'
	Controle interno (VIC)
	5' ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG 3'

3.5. SEQUENCIAMENTO MASSIVAMENTE PARALELO (NGS)

Baseado em publicações anteriores (63, 155) mostrando o impacto na etiopatogenia das neoplasias mieloides, um painel de 48 genes (**TABELA 11**) foi selecionado para sequenciamento através da técnica de sequenciamento massivo paralelo (NGS) usando a tecnologia de semicondutor iônico IonTorrent® (84).

TABELA 11 - Cobertura do painel de sequenciamento para neoplasias mieloides

Gene	Chr	Início Chr	Fim Chr	Ampli- cons	Total de Bases	Bases cobertas	Éxons
<i>ASXL1</i>	chr20	31021087	31021720	7	633	633	11
<i>ASXL1</i>	chr20	31022235	31027122	44	4887	4653	
<i>BCOR</i>	chrX	.	.	58	5661	5419	CDS
<i>BCORL1</i>	chrX	.	.	57	5256	5189	CDS
<i>BOD1L</i>	chr4	.	.	106	9416	9031	CDS
<i>BRAF</i>	chr7	140453075	140453193	2	118	118	15
<i>BRCC3</i>	chrX	154299800	154299925	2	125	125	1, 4
<i>BRCC3</i>	chrX	154305445	154305564	2	119	119	
<i>CALR</i>	chr19	13054527	13055304	7	777	672	9
<i>CBL</i>	chr11	.	.	37	2881	2794	CDS
<i>CEBPA</i>	chr19	.	.	8	1087	799	CDS
<i>CSF3R</i>	chr1	.	.	36	3555	3444	CDS
<i>CUX1</i>	chr7	.	.	72	5896	5361	CDS
<i>DNMT3A</i>	chr2	.	.	45	3385	3211	CDS
<i>ETV6</i>	chr12	.	.	18	1439	1328	CDS
<i>EZH2</i>	chr7	.	.	36	2732	2732	CDS
<i>FLT3</i>	chr13	.	.	49	3222	3167	CDS
<i>GATA1</i>	chrX	48649498	48649736	2	238	193	2, 3
<i>GATA1</i>	chrX	48650251	48650628	4	377	315	
<i>GATA2</i>	chr3	.	.	15	1587	1479	CDS
<i>GNAS</i>	chr20	.	.	45	6100	5371	CDS
<i>GNB1</i>	chr1	.	.	15	1113	1113	CDS
<i>IDH1</i>	chr2	.	.	20	1325	1236	CDS
<i>IDH2</i>	chr15	.	.	20	1469	1334	CDS
<i>JAK2</i>	chr9	.	.	52	3629	3596	CDS
<i>KDM6A</i>	chrX	.	.	62	4496	4327	CDS
<i>KIT</i>	chr4	55593384	55593490	1	106	106	8, 10, 11, 17
<i>KIT</i>	chr4	55593582	55593708	2	126	126	
<i>KIT</i>	chr4	55599236	55599358	1	122	122	
<i>KIT</i>	chr4	55589750	55589864	1	114	114	

<i>KRAS</i>	chr12	.	.	10	737	597	CDS
<i>MPL</i>	chr1	43814934	43815030	1	96	96	10
<i>NF-E2</i>	chr12	54688919	54689088	2	169	169	2, 3
<i>NF-E2</i>	chr12	54685891	54687165	12	1274	1269	
<i>NF1</i>	chr17	.	.	132	9251	9150	CDS
<i>NPM1</i>	chr5	.	.	17	1014	884	CDS
<i>NRAS</i>	chr1	.	.	9	610	610	CDS
<i>PHF6</i>	chrX	.	.	18	1585	1585	CDS
<i>PTPN11</i>	chr12	112926828	112926979	2	151	151	3, 7, 8, 13
<i>PTPN11</i>	chr12	112888122	112888316	2	194	194	
<i>PTPN11</i>	chr12	112910748	112910844	2	96	96	
<i>PTPN11</i>	chr12	112915455	112915534	1	79	79	
<i>RAD21</i>	chr8	.	.	31	2026	1953	CDS
<i>RIT1</i>	chr1	.	.	11	710	710	CDS
<i>RUNX1</i>	chr21	.	.	20	1842	1731	CDS
<i>SETBP1</i>	chr18	.	.	49	5040	4781	CDS
<i>SF3B1</i>	chr2	.	.	63	4195	4154	CDS
<i>SH2B3</i>	chr12	111855923	111856681	6	758	510	2
<i>SMC1A</i>	chrX	.	.	55	3952	3952	CDS
<i>SMC3</i>	chr10	.	.	60	3944	3813	CDS
<i>SRSF2</i>	chr17	.	.	6	686	664	CDS
<i>STAG2</i>	chrX	.	.	68	4137	4072	CDS
<i>TET2</i>	chr4	.	.	62	9607	9489	CDS
<i>TLR2</i>	chr4	.	.	23	2365	2172	CDS
<i>TP53</i>	chr17	.	.	22	1556	1556	CDS
<i>U2AF1</i>	chr21	.	.	16	920	920	CDS
<i>WT1</i>	chr11	32417803	32417953	2	150	150	7, 9
<i>WT1</i>	chr11	32413527	32413610	1	83	83	
<i>ZRSR2</i>	chrX	.	.	23	1559	1543	CDS

Abreviaturas: **CDS:** *coding sequences* (sequências codificadoras); **chr:** cromossomo

Resumidamente, a técnica consiste na extração de DNA genômico com o kit PreAnalytix (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e realização de uma reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para posterior geração de amplicons dos genes de

interesse a partir do kit Ion Ampliseq® 2.0 (Thermo Fisher Scientific®, Carlsbad, CA, EUA). Posteriormente os amplicons são marcados para sequenciamento em uma nova reação de PCR usando uma solução marcadora constituída por Ion P1 adaptor® e Ion Xpress Barcode X® (Qiagen® Hilden, Alemanha). Finalmente, através da tecnologia de semiconductor iônico, os amplicons são sequenciados.

Os resultados do sequenciamento foram analisados através do software Ion Reporter® (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) e o software Integrative Genomics Viewer – IGV (Broad Institute, Cambridge, MA, EUA). As variantes foram filtradas para exclusão de polimorfismos de nucleotídeos individuais (SNPs) de acordo com a base de dados da Universidade da Califórnia, Santa Cruz (UCSC), e de variantes não-exônicas e sinônimas. Foram incluídas somente variantes com uma razão alélica para a fração variante maior que 0,2 e com uma profundidade de cobertura > 25.

Num segundo momento, foi realizada a busca por variantes de menor frequência (fração de alelo variante entre 0,02 e 0,19) descritas no Catálogo de Mutações Somáticas no Câncer (COSMIC; <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) e/ou em que o valor P calculado pelo Ion Reporter seja $\leq 0,001$. Em seguida, as variantes candidatas foram inspecionadas visualmente utilizando-se o software IGV. As mutações somáticas foram consideradas presentes ou ausentes somente quando houve uma cobertura mínima de 500x. A potencial patogenicidade destas variantes foi avaliada com o uso de algoritmos de predição de patogenicidade *in silico*, como o MutationTaster® (156), SIFT (157) e Poly-Phen 2 (158).

No caso do subprojeto 1, as mutações identificadas no sequenciamento de leucócitos de medula óssea foram confirmadas em DNA de células epiteliais orais, onde, aplicando-se os mesmos métodos descritos acima, esperava-se que estivessem ausentes ou encontradas em frações alélicas de 0,5 ou 1,0.

3.6. GENOTIPAGEM DE MUTAÇÕES NOS GENES *RUNX1*, *CSF3R*, *TET2*, *CDC25C* E *CUX1*

Nos subprojetos 1 e 3, como confirmação de mutações identificados no painel de NGS (*RUNX1*, *CSF3R* e *TET2*, no caso do subprojeto 1 e *CUX1*, no caso do subprojeto 3) ou para pesquisa de mutação em genes sem cobertura no painel de NGS (*CDC25C*, no caso do subprojeto 1), foi realizada pesquisa dessas mutação por meio de sequenciamento convencional.

No caso do gene *CDC25C*, foi utilizado cDNA em dois pacientes que dispunham de RNA e gDNA em uma paciente que não dispunha de RNA. O *RUNX1* foi analisado por cDNA e os demais genes por gDNA.

3.6.1. EXTRAÇÃO DO RNA

Foram coletados 10 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA (0,1ml) para o isolamento do RNA a partir de leucócitos. Os tubos de sangue foram centrifugado a 1383 g, a 4°C para separar o plasma, que foram descartados, sendo o restante transferido para um tubo tipo Falcon de 50 ml com uma mistura de cloreto (0,144 M) e bicarbonato de amônio (0,01 M) tratados com DEPC (dietilpirocarbonato), 5 vezes o volume de células, incubados por 30 minutos no gelo para lisar as hemácias.

As amostras foram centrifugadas a 1016 g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* formado foi adicionado 1 ml de Trizol, que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, que rompe as células, mantendo a integridade do RNA, sendo transferidos para um tubo de microcentrífuga.

À mistura de células e trizol foram adicionados 200 µl de clorofórmio, que separa a solução em fase aquosa e orgânica, os tubos foram misturados e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo os tubos centrifugados a 15700 g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para outro tubo, sendo adicionados 500 µl de isopropanol para precipitar o RNA por agitação. As amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 15700 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, no RNA foi realizado uma lavagem com álcool 75% diluído com água destilada estéril tratada com DEPC e centrifugada a 12400 g por 5 minutos a 4°C, ao RNA foi adicionado água destilada estéril tratada com DEPC, incubados no gelo por 30 minutos, em seguida a amostra foi quantificada e armazenada em freezer -80°C.

3.6.2. SÍNTESE DE CDNA

Para a síntese do cDNA RNA total quantificado por espectrofotometria, sendo utilizado o equipamento NanoDrop ND – 100 (Life Technologies, Inc., Rockland, DE, EUA). Foi considerado indicativo de RNA de boa qualidade amostras que apresentaram razão entre as leituras nos comprimentos de onda 260/280 nm entre 1,8 e 2,0 e avaliada a sua concentração.

As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA)

Para a transcrição as amostras de RNA foram tratadas com DNase, para a eliminação de contaminantes de DNA genômico. O tratamento das amostras constituiu na adição de 1 µl de DNase I, 1 µl de tampão de reação 10x (100mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 1mM CaCl₂) e água suficiente para um volume final de 10 µl. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos, a reação foi bloqueada adicionando 1 µl de EDTA (50 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para realizar a transcrição. A síntese do cDNA complementar foi realizada adicionando ao RNA tratado, 1 µl de oligo DT (0,5 µg/µl) que foi incubado a 65°C por 5 minutos, em seguida foi adicionado 4 µl do tampão de reação 5X (Reaction Buffer 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl de inibidor de RNase (Ribolock RNase Inhibitor – 20U/ µl - (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), 2 µl de dNTPs (10mM) e 1 µl da enzima RevertAid H Minus (200 U/ µl) (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), volume final da reação 20 µl, os reagentes foram misturados e incubados a 42°C por 60 minutos e a enzima inativada por uma incubação a 70°C por 5 minutos. As amostras foram submetidas à reação de amplificação pela PCR e posterior sequenciamento automático.

3.6.3. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS ESPECÍFICAS

A caracterização das alterações moleculares nos genes de interesse foi realizada a partir de amostras do DNA genômico e amostras de cDNA, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) conforme demonstrados na **TABELA 12**.

TABELA 12 - Primers utilizados para detecção de mutações nos genes de interesse

Genes	Fragmento/ éxon	Forward		Reverse	
CUX1	Éxon 9	5'	TGGCATCAGCAAGCACATCTC 3'	5'	GATAACCCGGCCTTCTAACTTCG 3'
TET2	Éxon 11	5'	GCAATGGAAACCCTATCAGTGGAC 3'	5'	GGATTCTTTAAAGGGTTGTGGC 3'
RUNX1 (cDNA)	Éxons 4 e 5	5'	TGGCTGGCAATGATGAAAACTAC 3'	5'	GTTAAAGGCAGTGGAGTGGTTC 3'
CSF3R	Éxon 17	5'	TGAGGAACATACTAGTGCTTTGC 3'	5'	CACCGGCTTCTTTTCATCCTCC 3'
CDC25C (cDNA)	Éxon 9	5'	AGCCTTTGTCCCTTTACCCTCCC 3'	5'	ACCAGGCATTCTCGGCAAAACAG 3'
	Éxon 8	5'	TGGCCTAACATCTGGAAACCCTG 3'	5'	GGGAAGACGGTATGATGACAAAC 3'
	Fragmento 1	5'	GCGGCTGTTGATATTCTTGCTC 3'	5'	GGGTTCCCTCCAGACAAAATGC 3'
	Fragmento 2	5'	GCATTTTGTCTGGAGGAACCC 3'	5'	CACTTCTGCTCACCTTTGCTTC 3'
CDC25C	Fragmento 3	5'	GAAGCAAAGGTGAGCAGAAAGTGG 3'	5'	CAGACAGCGGCACATTCGGGG 3'
	Fragmento 4	5'	GTATGTCAACCCAGAAACAGTG 3'	5'	GGTTTCTGCAGTGCTTTTGGTG 3'

As reações de amplificação foram realizadas a partir de 100 ng de cDNA, 0,3 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10 mM), 1x de tampão da enzima (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,1 μM de cada *primer* e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), quantidade suficiente para um volume final de 30 μl . As reações foram submetidas a condições de ciclos pré-determinadas e padronizadas: 96°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguidas de 35 ciclos de 96°C por 1 minuto, temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos por 1 minuto e 72°C por 1 minuto para a síntese do produto.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados sob luz UV, com marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) para checagem do produto amplificado.

3.6.4. IDENTIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES DE INTERESSE

Para a análise molecular das alterações nos genes de interesse foi utilizado o método de sequenciamento automático direto das regiões do DNA genômico e cDNA amplificadas. Após a amplificação das regiões específicas pela técnica da PCR, o produto amplificado foi purificado com a combinação de duas enzimas, que removem produtos não incorporados durante a amplificação. Para isso, foi realizada uma reação com 10 μl do produto amplificado, 10 U exonuclease I (Exo I) que degrada oligonucleotídeos residuais e demais produtos simples fita, 1U da fosfatase alcalina (SAP) que degrada os nucleotídeos não incorporados, os tubos foram incubados no termociclador por 15 minutos 37°C e inativados por 15 minutos a 80°C. O produto purificado foi quantificado em gel de agarose 2,0% com marcador de quantificação (*Low DNA Mass Ladder*; Invitrogen, Thermo Fisher, EUA) para avaliar e estimar a sua concentração de acordo com o tamanho do produto amplificado. Em seguida foi realizada a reação de sequenciamento, utilizando o Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para o sequenciamento automático direto das regiões gênicas amplificadas, foi utilizado de 10-20 ng do produto de PCR purificado; 1 μl de oligonucleotídeo 1,6 μM (*sense* e *antisense* em reações distintas); 1 μl Big Dye, 1 μl de solução tampão (Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e $MgCl_2$ 5 mM) e água de injeção para 10 μl . Em um termociclador automático as amostras foram submetidas a 25 ciclos de desnaturação inicial 96°C por 20 segundos, temperatura de anelamento dos *primers* por 20 segundos e

60°C por 4 minutos para a síntese. O produto da reação de sequenciamento foi submetido à purificação com 8 µl de água de injeção, 32 µl de etanol absoluto. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000 g, o sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 100 µl de etanol 70%, centrifugada novamente por 20 minutos a 4000 g e o sobrenadante descartado, após o descarte, foi submetida à centrifugação invertida por 7 segundos a 200 g e aquecida no termociclador a 65°C por 10 minutos para completa remoção do etanol residual.

Para a eletroforese, adicionou-se 10 µl de formamida deionizada, as amostras foram desnaturadas a 96°C por 5 minutos e submetidas eletroforese capilar no sequenciador automático ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, EUA) e análise das sequências gênicas.

3.7. CLONAGEM GÊNICA PARA DETERMINAÇÃO DO STATUS *CIS* OU *TRANS* DA MUTAÇÃO *RUNX1*

Para a determinação dos status *cis* ou *trans* foi realizada a clonagem gênica. Após a amplificação do fragmento pela PCR, foi realizada uma reação de ligação utilizando 1,5 µl do produto amplificado, 5 µl buffer 2x T4 DNA ligase, 1 µl do vetor, 1 µl da T4 ligase e água q.s.p. para 10 µl (pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega Corporation, Madison, WI, USA). A reação foi incubada a 4°C por 12-16 horas e após esse período, foi realizada a transformação bacteriana. Para isso 5 µl do produto de ligação foi adicionado às células competentes, *blue cells*, e incubadas no gelo por 30 minutos. Imediatamente após foram colocadas em banho-maria a 42°C por 1 minuto e 30 segundos, novamente transferidas para o gelo por 2 minutos, para o choque térmico.

Todo o volume da reação foi adicionado em 800 µl de SOC (2 g de triptona; 0,5 g extrato de levedura; 1 ml NaCl 1M; 0,25 ml de KCl 1M de KCl 1M; 1 ml MgCl₂; 1 ml de MgSO₄; 1 ml de glicose 2M q.s.p. 100 ml), e incubado a 37°C, a 350 rpm por 1 hora na incubadora com agitação. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 6450 g, mais ou menos 600 µl do sobrenadante foi descartado, sendo o *pellet* formado foi ressuspenso no volume restante e 120 µl foi plaqueado em placa LB ágar (5 g de triptona; 2,5 g extrato de levedura; 5 g de NaCl; 5 g de ágar, q.s.p. 500ml) com ampicilina (50mg/ml)/X-gal (80µg/ml)/IPTG (0,5mM). As placas foram incubadas em estufa

a 37°C por 12-16 horas e as células contendo o inserto foram coletadas e colocadas em placa de 96 poços contendo 120 µl meio LB líquido (contendo 5 g de triptona, 2,5 g de extrato de levedura, 2,5 g de cloreto de sódio, q.s.p. 500 ml) e ampicilina (50 mg/ml). As placas foram incubadas a 37°C, 130 rpm por 12-16 horas em estufa. Após esse período foi realizado a amplificação pela PCR utilizando os *primers* do plasmídeo (T7-SP6), para a reação foram utilizados 2 µl dos clones, 5 µM de primer, 0.2 µM de dNTPs, e 1 U da taq DNA polimerase e em seguida realizada a reação de sequenciamento.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystem, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante, para posterior eletroforese em sequenciador automático (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer) e análise das sequências dos clones.

3.8. ISOLAMENTO DAS ECFCS

O estabelecimento da cultura de ECFCS foi realizado de acordo com o protocolo de Lin *et al.*, com modificações de Sakamoto *et al.* (130, 159). Células mononucleares de pacientes e indivíduos saudáveis foram isoladas a partir de amostras de sangue periférico (45 ml), coletadas em tubos contendo heparina sódica (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, EUA) e processadas logo após a coleta. Após centrifugação das amostras em gradiente de densidade com Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) a 317 g por 30 minutos, em temperatura ambiente, a camada de células mononucleares foi transferida para um novo tubo e lavada com solução tampão de fósforo (PBS) e posteriormente com meio endotelial basal (EBM-2 *Endothelial Basal Medium*, Lonza, Walkersville, MD, EUA).

Aproximadamente 1×10^7 células mononucleares foram cultivadas em meio de cultura EBM-2 suplementado com os fatores do kit de meio de crescimento endotelial (EGM™-2 Single Quots™ – CC4176 - Lonza, Walkersville, MD, EUA), 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% penicilina/estreptomicina (100 U/ml) e 1% L-glutamina (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

As culturas de células foram incubadas a 37°C, em 5% de CO₂. Na primeira semana, o meio foi trocado diariamente a fim de eliminar as células não aderentes. Após este período, a troca ocorreu em dias alternados.

O crescimento das primeiras colônias de ECFC ocorreu em torno de 9 a 21 dias de cultura, com a morfologia característica de *cobblestone*. A primeira passagem

foi realizada em torno de 30 dias após o início da cultura, na qual as células foram trocadas de placa. A segunda ocorreu com cerca de 35 dias de cultura e a terceira passagem foi realizada aproximadamente após 40 dias de cultura. Depois da terceira passagem, as células foram congeladas numa concentração de 1×10^6 células/ml.

3.9. HUVECS

Células endoteliais primárias da veia umbilical humana (HUVEC; pooled; C2519A) foram obtidas (Lonza, Walkersville, MD, EUA) e cultivadas em garrafas T75 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) com meio de cultura EBM-2 (Lonza Walkersville, MD, EUA), suplementado com os fatores do kit EGMTM-2 Single QuotsTM – CC4176 - Lonza, Walkersville, MD, EUA, 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% penicilina/estreptomicina (100 U/ml) e 1% L-glutamina (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). As culturas foram incubadas a 37°C, em 5% de CO₂, e o meio foi trocado em dias alternados. Depois da terceira passagem, as células foram congeladas numa concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ml.

3.10. CARACTERIZAÇÃO DAS ECFCS

A natureza endotelial das ECFCS foi verificada através do uso de citometria de fluxo. Ao final da terceira passagem, 1×10^6 células/ml foram suspendidas em tubos para citometria com 5 µl de anticorpos específicos conjugados. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD31-FITC, clone MBC 78.2 (Invitrogen, Camarillo, CA), anti-CD144-PE, clone TEA 1/31 (Beckman Coulter, Marseille, France); anti-CD146-PE, clone 128018 (R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-VEGF R2/KDR-PE, clone 89106 (R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-CD34-FITC, clone My10 (BD, San Jose, CA), anti-CD45-PerCP, clone 2D1 (BD, San Jose, CA) and anti-CD133-APC, clone AC133 (Milteny, Biotech, Auburn, CA). Após 30 minutos de incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas com PBS e centrifugadas. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 300 µl de PBS para a aquisição de 10.000 eventos em citômetro de fluxo (FACS Calibur – BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica). A análise dos dados foi realizada no software BD FACS DIVA 7.0 (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica).

3.11. ENSAIO DE ADESÃO ESTÁTICA DE ECFCs APÓS COCULTURA COM HEMÁCIAS

O ensaio de adesão foi modificado de Gambero *et al.* (160). As hemácias foram obtidas de indivíduos saudáveis, a partir de 4 ml de sangue periférico coletados em tubos contendo citrato de sódio (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, EUA). As amostras foram transferidas para um tubo cônico e centrifugadas por 10 minutos para a remoção do plasma e da camada de células mononucleares. Posteriormente, elas foram lavadas e centrifugadas com PBS três vezes, a 700 g, 600 g e 480 g, por 10 minutos em cada etapa. Após centrifugação o *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de PBS e o número total de hemácias foi calculado no contador automático Cell Dyn Emerald (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, EUA). A concentração final foi ajustada a 2×10^8 células/ml com o meio de cultura Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Posteriormente, placas com 96 poços foram preparadas por *coating* individual nos poços, com 50 µl de ECFCs de pacientes ou de indivíduos saudáveis ou de HUVECs, na concentração $1,5 \times 10^4$ células/ml, até a confluência, por 24 horas, a 37°C em 5% CO₂. Um microambiente inflamatório foi estimulado com TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), na concentração de 10 ng/ml, por 3 horas.

O meio de cultura presente na placa foi descartado e as hemácias de indivíduos saudáveis previamente isoladas foram adicionadas na concentração de $2,0 \times 10^8$ células/ml num volume de 50 µl, em meio HBSS e incubadas com as ECFCs, durante 30 minutos (37°C em estufa, 5% CO₂) para permitir a adesão. Após a incubação, as células não aderidas foram removidas gentilmente com três lavagens de 100 µl com PBS. Cinquenta microlitros de meio HBSS foram adicionados a cada poço onde foi realizada a reação. Concentrações variadas, em porcentagem de 0, 5, 8, 10, 20 50, 80 e 100 da suspensão original de células vermelhas (2×10^8 células/ml), foram adicionadas em poços sem ECFCs para construir uma curva padrão.

A cada poço (reação de adesão e curva padrão) foram adicionados 50 µl da solução de revelação, o Drabkin (Sigma, St Louis, USA). Esse reagente tem a propriedade de lisar as células vermelhas e expor a hemoglobina presente nessas células. A hemoglobina foi oxidada em cianometahemoglobina e a intensidade de cor desse composto foi medida colorimetricamente no leitor de ELISA a 540 nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação da

absorbância das amostras desconhecidas com a absorbância da curva padrão que apresenta concentrações celulares conhecidas.

Os experimentos foram realizados em triplicata, com pelo menos dois experimentos por colônia de ECFCs ou HUVEC utilizada. A **FIGURA 3** contém um desenho esquemático da placa utilizada neste experimento.

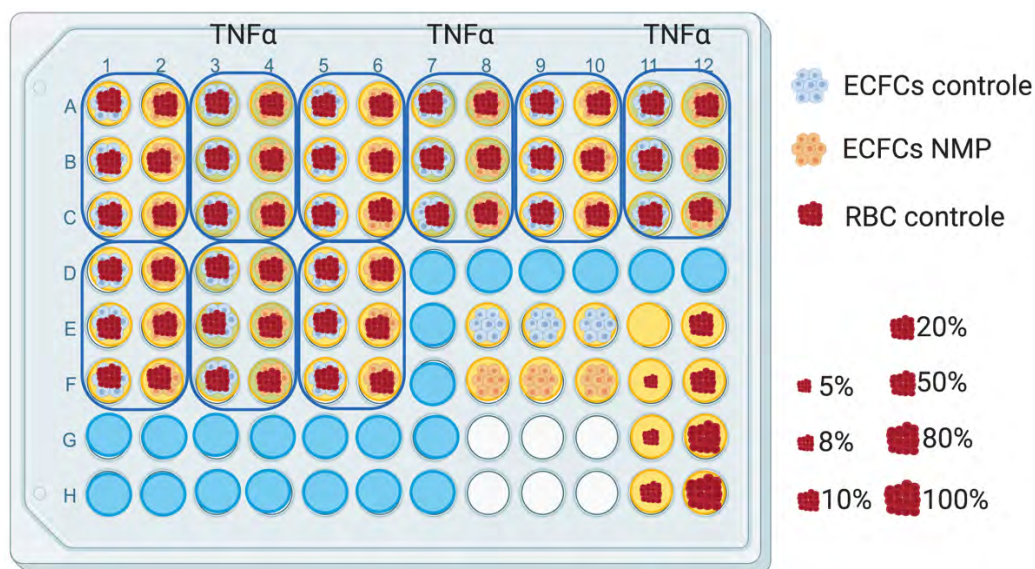


FIGURA 3 - Desenho esquemático do layout da placa utilizada para os ensaios de adesão. Os poços em branco e azul representam poços vazios. **RBC**: hemácias; **ECFCs**: células formadoras de colônia endotelial. **TNFα**: fator de necrose tumoral α .

3.12. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS ECFCs

A capacidade de migração das ECFCs e HUVECs foi avaliada utilizando-se a metodologia de "scratch" (*wound healing assay*) (161). HUVECs ou ECFCs de indivíduos saudáveis e de pacientes foram cultivadas, em placa de 24 poços, até a confluência, por 24 horas a 37°C em 5% CO₂. No dia seguinte, o meio foi retirado e a cultura lavada em PBS para descartar possíveis células mortas no sobrenadante. Em cada poço da placa, foram colocados 500 μ L de meio EBM-2 (Lonza, Walkersville, MD, EUA) e foi realizado um "risco" no meio da placa (*scratch*) com ponteira para micropipetas P10, deixando um espaço para a migração celular.

As células do sobrenadante foram removidas aspirando-se o meio de cada poço e em seguida adicionou-se meio fresco suplementado. Após o risco, a placa foi levada a um microscópio invertido (Zeiss LSM780-NLO, Carl-Zeiss, Jena, Germany), equipado com uma câmara ambiental para controle de temperatura, concentração de

CO₂ e umidade. Imagens foram tomadas cada hora no aumento de 10X (Zeiss Axio-cam 506 mono, Carl-Zeiss, Jena, Alemanha), até 24 horas após o *scratch*. As imagens foram quantificadas usando ImageJ (National Institutes of Health, NIH Image, Bethesda, MD). O fechamento da ferida foi quantificado como a razão entre a área do arranhão na hora zero e em cada hora subsequente, usando três imagens por poço. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.13. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ANGIOGÊNESE DAS ECFCS

A capacidade de angiogênese das ECFCs e HUVECs foi avaliada através da formação de tubo endotelial *in vitro*. Foram estabelecidas culturas de HUVECs ou ECFCs em placas de 24 poços (10 x 10⁴ células/poço) com Matrigel™ (BD Biosciences, Carlsbad, CA) por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Cinco fotos por poço foram tomadas após 5, 15, 24 e 40 h usando uma câmera (Olympus DP72, Olympus, Miami, FL) associada a um microscópio invertido (Olympus IX81, Olympus, Miami, FL), com uma objetiva de 4X em modo de contraste de fase. Após algumas tentativas de padronização, a hora 15 foi selecionada como melhor ponto para avaliação. As imagens foram analisadas usando uma versão personalizada do “Angiogenesis Analyzer” desenvolvida para o software ImageJ (162). O software identifica e calcula o número de parâmetros de rede vascular (tramas, segmentos e nodos). A soma do total de parâmetros constitui uma avaliação indireta da capacidade de angiogênese.

3.14. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ECFCS POR ARRAY DE PCR

A expressão gênica das ECFCs foi avaliada por *array* de PCR de RNA obtido após cocultura com hemácias, conforme descrito acima para o experimento de adesão. As ECFCs foram tripsinizadas e centrifugadas a 317 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao *pellet* de células foi adicionado solução de lise para a extração de ácido ribonucleico (RNA). O RNA de alta qualidade foi extraído usando o RNeasy Protect Cell Mini Kit, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen®, Hilden, Alemanha).

A quantidade e pureza do RNA extraído foram analisadas por espectrofotometria Nanodrop ND-1000 (Life Technologies, Inc., Rockland, DE, EUA). Somente amostras puras o suficiente (razão A260 / A230 > 1,8, razão A260 / A280 = 1,8-2,0), com concentração razoável (> 100 ng/μl), foram usadas como modelos para a síntese

de cDNA. As amostras de cDNA geradas (20 µl) foram então diluídas com 91 µl de água livre de RNase e armazenadas a -20° C até análises posteriores.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando de *kit RT² First Strand* (Qiagen, Maryland, EUA) que é específico para a obtenção da fita complementar que foi utilizado no *array* de PCR. Para a reação, 0,5 µg de RNA das ECFCs foram tratados com 2 µl do tampão GE e água livre de nuclease q.s.p. para 10 µl. As amostras foram incubadas no termociclador a 42°C por 5 minutos e colocadas no gelo por 1 minuto, para a eliminação de DNA genômico e realização da transcrição.

Nas amostras tratadas, foram adicionados 4 µl do tampão 5x buffer BC3, 1 µl do controle P2, 2 µl do mix transcriptase reversa RE3 e água livre de nuclease q.s.p. para 10 µl. As amostras foram incubadas no termociclador a 42°C por 15 minutos e a 95°C por 5 minutos. Nessa reação foram adicionados 91 µl de água livre de nuclease, os tubos foram colocados no gelo para a realização do Real Time PCR Array.

A PCR em tempo real foi realizada usando um sistema de detecção de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 (Thermo Fisher Scientific®, Carlsbad, CA, EUA). A expressão gênica foi examinada usando dois *arrays* de PCR para RNA: um para Biologia de células endoteliais humanas RT2 Profiler™ PCR Array PAHS-015ZA (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e outro para vias de transdução de sinais (RT2 Profiler™ PCR Array PAHS-014ZA). O primeiro avalia a expressão de 84 genes (*ACE; ADAM17; AGT; AGTR1; ALOX5; ANGPT1; ANXA5; APOE; BAX; BCL2; BCL2L1; CALCA; CASP1; CASP3; CAV1; CCL2; CCL5; CDH5; CFLAR; COL18A1; CX3CL1; EDN1; EDN2; EDNRA; ENG; F2F; F3; FAZ; FASLG; FGF1; FGF2; FLT1; FM1; HIF1A; HMOX1; ICAM1; IL11; IL1B; IL3; IL6; IL7; ITGA5; ITGAV; ITGB1; ITGB3; KDR; KIT; KLK3; MMP1; MMP2; MMP9; NOS3; NPPB; NPR1; OCLN; PDGFRA; PECAM1; PF4; PGF; PLAT; PLAU; PLG; PROCR; PTGIS; PTGS2; PTK2; SELE; SELL; SELPLG; SERPINE1; SOD1; SPHK1; TEK; TFP1; TGFB1; THBD; THBS1; TIMP1; TNF; TNFS10; TYMP; VCAM1; VEGFA; VWF*), envolvidos na permeabilidade e tônus vascular, angiogênese, ativação de células endoteliais e lesão celular endotelial. O segundo avalia a expressão de 84 genes (*ACSL3; ACSL4; ACSL5; ADM; ARNT; ATF4; AXIN2; BAX; BBC3; BCL2; BCL2A1; BCL2L1; BIRC3; BMP2; BMP4; BTG2; CA9; CCL5; CCND1; CCND2; CDKN1A; CDKN1B; CEBPD; CPT2; CSF1; DAB2; EGFR; EMP1; EPO; FABP1; FAZ; FCER2; FOSL1; FTH1; GADD45A; GADD45B; GATA3; GCLC; GCLM; GSR; HERPUD1; HES1; HES5; HEY1; HEY2; HEYL; HMOX1; ICAM1; ID1; IFNG; IFRD1; IRF1; JAG1; LDHA; LFNG; LRG1; MCL1; MMP7; MYC; NOTCH1;*

NQO1; OLR1; PCNA; PPARD; PTCH1; RB1; SERPINE1; SLC27A4; SLC2A1; SOCS3; SORBS1; SQSTM1; STAT1; TNF; TNFSF10; TXN; TXNRD1; VEGFA; WISP1; WNT1; WNT2B; WNT3A; WNT5A; WNT6) responsivos a ativação ou inibição de 10 vias de transdução de sinal comumente estudadas, incluindo vias importantes para o desenvolvimento, e processos imunológicos, metabólicos ou ativados por stress.

O array de RT2 Profiler™ contém *primers* internos para 84 genes testados e 5 de limpeza e elementos de controle positivo para determinar a eficiência da reação de transcrição reversa, o desempenho da reação de PCR e a detecção de contaminação genômica por DNA. A mistura de PCR para 100 reações continha 1150 µl de SYBR Green ROX FAST Mastermix (Qiagen®, Hilden, Alemanha) 102 µl de modelo de cDNA e 1048 µl de água livre de RNase. A mistura de reação de PCR foi adicionada aos poços da placa de PCR em quantidades iguais (20 µl) e, em seguida, o programa de ciclagem de PCR em tempo real foi executado. O programa de ciclagem térmica utilizado foi o seguinte: 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos: desnaturação a 95°C por 15s, com 30s de recozimento e alongamento a 60°C, seguidos de análise de curva de fusão. O software online GeneGlobe (<https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>) foi utilizado para análise.

Para determinar as diferenças significativas nas características clínicas entre os grupos, foi realizado o teste de Wilcoxon, com diferença significativa de $P < 0,05$. Os valores do Limiar do Ciclo (CT), obtidos por experimentos de PCR em tempo real, foram utilizados para calcular as alterações relativas na expressão gênica de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. RPLPO foi escolhido do grupo dos cinco genes *housekeeping* (HKG) como o melhor e menos variável gene de referência para normalizar os dados de expressão gênica. Alterações no nível de expressão gênica para genes avaliados foram avaliadas para grupos de casos em relação ao grupo controle com nível de expressão gênica configurado arbitrariamente como 1.

3.15. DOSAGEM PLASMÁTICA DE CITOCINAS, PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA COAGULAÇÃO E MOLÉCULAS DE ADESÃO

O plasma de pacientes e indivíduos saudáveis da coorte de expansão foi coletado para a dosagem de mediadores inflamatórios, pró-coagulantes e de moléculas de adesão através de kits MILLIPLEX™ (EDM Millipore, Billerica, MA, EUA), na qual

é possível detectar vários alvos num único teste (multiplex), enquanto mantém uma elevada sensibilidade e especificidade dos resultados.

A Tecnologia Luminex™ xMAP é baseada na coloração de microesferas de poliestireno por dois fluoróforos. Através da concentração desses corantes, podem ser criados até 100 conjuntos diferentes de microesferas identificadas pelo instrumento Luminex. Microesferas com diferentes fluorescências ligadas a anticorpos de captura são incubadas com a amostra. A placa é então lavada seguida de incubação com anticorpo de detecção. Após nova lavagem, é adicionado estreptavidina-ficoeritrina ao complexo. Os conjuntos são passados através de uma câmara de detecção. O laser de classificação (vermelho 635 nm) identifica a coloração das microesferas. O laser repórter (verde 532 nm) identifica a fluorescência e consequentemente a concentração dos analitos. Os kits e os analitos utilizados foram: Human Cytokine/Chemokine Panel 1 – HCYTOMAG-60K (sCD40L, IL-1B, IL-8, PDGF-AA, PDGF-AB/BB) e Human Cardiovascular Disease-CVD Panel 2 – HCVD2MAG (ADAMTS13, sICAM-1, sVCAM-1, sP-selectina).

3.16. DOSAGEM PLASMÁTICA DE ADAM17 E VEGF

Novamente, o plasma coletado de pacientes e indivíduos saudáveis da coorte de expansão foi utilizado para a dosagem de ADAM17 e VEGF.

Para a análise da concentração de ADAM17, foi utilizado o Human TACE (ADAM17) ELISA Kit (ThermoScientific, Frederick, MD) de acordo com as recomendações do fabricante. Primeiramente foram realizadas as devidas diluições das soluções de acordo com o previsto no manual. As amostras foram diluídas na concentração 1:1 sendo 50 µl do plasma e 50 µl do diluente sugerido pelo fabricante. A curva padrão foi feita através de diluições seriadas, seguindo as orientações do kit, partindo do ponto inicial de 5,000 pg/ml até o 0 pg/ml (branco). Foi adicionado 100 µl em cada poço e incubado por 2 horas e 30 minutos, todas as amostras e curva padrão foram realizadas em duplicata.

Após a incubação, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem previamente diluído, adicionando 300 µl em cada poço, com o auxílio de uma pipeta multicanal, em seguida foi adicionado 100 µl do anticorpo biotinilado e incubada por mais 1 hora. A placa foi lavada e foi acrescentado 100 µl de estreptavidina em cada poço, e incubada novamente por 45 minutos. Após esse período, a placa foi lavada e foi adicionado 100 µl substrato TMB em cada poço e incubada por mais 30 minutos,

passado o tempo de incubação, foi adicionado 50 µl de ácido (*stop solution*) para parar a reação. A absorbância da placa foi medida em 450 nm.

Para a análise da concentração de VEGF foi utilizado o Quantikine® ELISA Human VEGF Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN), conforme as instruções do fabricante. Primeira foram realizadas as diluições apropriadas, conforme previsto no manual. As amostras foram diluídas na concentração 1:1 sendo 100 µl do plasma e 100 µl do diluente sugerido pelo fabricante. A curva padrão foi feita através de diluições seriadas, seguindo as orientações do kit, partindo do ponto inicial de 1.000 pg/ml até o 0 pg/ml (branco). Foi adicionado 200 µl em cada poço e incubado por 2 horas, todas as amostras e curva padrão foram realizadas em duplicata.

Após a incubação, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem previamente diluído, adicionando 400 µl em cada poço, com o auxílio de uma pipeta multicanal, em seguida foi adicionado 200 µl do anticorpo biotinilado e incubada por mais 2 horas. A placa foi lavada e foi adicionado 200 µl substrato em cada poço e incubada por mais 45 minutos, passado o tempo de incubação, foi adicionado 50 µl de ácido (*stop solution*) para parar a reação. A absorbância da placa foi medida em 450 nm.

3.17. REVISÃO SISTEMÁTICA

No subprojeto 1, de maneira a permitir uma caracterização mais ampla dos achados de variantes somáticas detectadas ao diagnóstico de LMA/SMD em indivíduos com *RUNX1* FPD e no subprojeto 3, de maneira a permitir uma sistematização dos achados de variantes detectadas em pacientes com TE TN submetidos a NGS foi realizada uma revisão sistemática.

A revisão sistemática seguiu as recomendações do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (163). Para o subprojeto 1, foi realizada uma revisão sistemática das publicações contendo casuísticas de pacientes com *RUNX1* FPD que evoluíram com diagnóstico de uma neoplasia mieloide e que dispunha de dados de sequenciamento realizado no diagnóstico desta neoplasia. Nos buscamos esses artigos nas bases: EMBASE, Scopus, MEDLINE via PubMed, Cochrane Library e Web of Science. Foram usados os termos de busca '*RUNX1*' e '*familial platelet disorders*'. A busca realizada se restringiu aos artigos publicados em língua inglesa, com texto completo disponível e contendo dados do sequenciamento de DNA ao diagnóstico de uma neoplasia mieloide usando uma das seguintes

técnicas: baseado em *array* de PCR, WES, WGS e NGS direcionado. Também foram incluídos achados de hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) e citogenética convencional, quando estes descreveram deleção de 21q22, *locus* cromossômico do gene *RUNX1*. Pacientes com neoplasias hematológicas não mieloides foram excluídos.

Já para o subprojeto 3, foi realizada uma revisão sistemática uma busca pelas publicações que relatassem os resultados do uso de NGS em pacientes com TE TN. Foram interrogadas as mesmas bases utilizadas na revisão sistemática do subprojeto 1, utilizando-se dos termos de busca '*sequencing*' e '*essential thrombocythemia*'. Da mesma forma que para o subprojeto 1, foram selecionados somente publicações em inglês, com texto completo disponível e que relatassem resultados de NGS usando WES, WGS ou NGS direcionado. Além disso, foram incluídos somente relatos em que o DNA sequenciado foi extraído de granulócitos e com resultados de sequenciamento por indivíduos.

3.18. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando-se os softwares Graphpad Prism 8.2 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e SPSS 25 (IBM, Armonk, NY, EUA). A distribuição normal de variáveis contínuas foi testada com o método de Shapiro-Wilk. Variáveis contínuas foram descritas como média $\pm$ erro padrão da média, quando com distribuição normal ou, do contrário, como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas com o teste T de Student. O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar variáveis contínuas com distribuição assimétrica. ANOVA foi usado para comparar 3 ou mais grupos com uma distribuição normal, usando-se o método de Bonferroni para comparações múltiplas. No caso de distribuição assimétrica, o teste de Kruskal-Wallis foi usado para esta comparação. A análise de sobrevida foi feita de acordo com o método de Kaplan-Meier. P valores iguais ou menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

LONGITUDINAL SEQUENCING OF *RUNX1* FAMILIAL PLATELET DISORDER:
NEW INSIGHTS INTO GENETIC MECHANISMS OF TRANSFORMATION TO MYE-
LOID MALIGNANCIES

Longitudinal sequencing of *RUNX1* familial platelet disorder: new insights into genetic mechanisms of transformation to myeloid malignancies

Bruno K. L. Duarte,^{1,2} 
Gabriela G. Yamaguti-Hayakawa,^{1,2}
Samuel S. Medina,¹ Lúcia H. Siqueira,¹
Brooke Snetsinger,³ Fernando F.
Costa,^{1,2} Michael J. Rauh³ and
Margareth C. Ozelo^{1,2} 

¹INCT do Sangue, Hemocentro

UNICAMP, University of Campinas,

²Department of Internal Medicine, Faculty
of Medical Sciences, University of
Campinas, FCM, Campinas, SP, Brazil
and ³Department of Pathology and
Molecular Medicine, Queen's University,
Kingston, ON, Canada

Received 12 January 2019; accepted for
publication 10 April 2019

Correspondence: Dr Bruno K. L. Duarte,
Hemocentro, Universidade Estadual de
Campinas, Rua Carlos Chagas, 480 Cidade
Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP
13083-878, Brazil.

E-mails: duartebk@unicamp.br or
bklduarte@gmail.com

Summary

The mechanisms by which patients with *RUNX1* familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancies (FPDMM) develop myeloid malignancies (MM) are not fully understood. We report the results of targeted next-generation sequencing on three patients with *RUNX1* FPDMM who developed acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndromes (AML/MDS). DNA samples were collected from bone marrow, peripheral blood and buccal swabs at different time points. One patient had clonal haematopoiesis, represented by an *SRSF2* p.P95R variant, prior to his AML diagnosis, when he developed an additional *NRAS* p.G12D variant. His sister presented to us with MDS, with a *TET2* p.S471fs and identical *NRAS* p.G12D variant. The third patient, from another family, had an additional *RUNX1* p.R204X and an *NFE2* p.Q139fs variant at AML diagnosis. This constitutes the first report of *NFE2* variants in AML without extramedullary disease and *NRAS* variants in AML/MDS in the setting of FPDMM. A systematic review of the literature including our findings distinguishes two genetic landscapes at AML transformation from FPDMM characterized by either the presence or absence of somatic abnormalities in *RUNX1* with or without variants in genes usually associated with MM. Whether clonal haematopoiesis precedes transformation only in patients without somatic abnormalities in *RUNX1* needs further confirmation.

Keywords: myeloid neoplasms, acute myeloid leukaemia, clonal dynamics, familial platelet disorders, cancer genomics.

Germline predisposition is currently one of the major known risk factors for the development of myeloid neoplasms. In a recent study (Churpek *et al*, 2015), a pathogenic germline variant was found in 29% of the families with 2 or more biological relatives with myelodysplastic syndromes (MDS) or acute myeloid leukaemia (AML), a frequency similar to what would be expected in families with a longstanding history of breast cancer associated with known genetic predisposition. The creation of a new diagnostic entity, named 'Myeloid neoplasms with germline predisposition' in the recently updated World Health Organization classification of myeloid neoplasms (Arber *et al*, 2016) highlights the importance of this risk factor.

RUNX1 was the first gene associated with a predisposition to myeloid malignancies (MM) (Song *et al*, 1999). Individuals carrying germline variants in this gene usually present

with mild thrombocytopenia with normal-sized platelets, a mild bleeding tendency and a predisposition to MM (Latger-Cannard *et al*, 2016), a phenotype currently termed *RUNX1* familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancies (*RUNX1* FPDMM). The rate of development of MM in these individuals is about 35–40% (Michaud, 2002; Owen *et al*, 2008; Preudhomme *et al*, 2009; Liew & Owen, 2011; Latger-Cannard *et al*, 2016), but no specific marker or genetic mechanism has been implicated in this process.

Several studies (Preudhomme *et al*, 2009; Yoshimi *et al*, 2014; Churpek *et al*, 2015; Brown *et al*, 2016; Haslam *et al*, 2016; Sakurai *et al*, 2016; Manchev *et al*, 2017; Tawana *et al*, 2017; Ng *et al*, 2018) have addressed this question by sequencing DNA samples from bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) collected at the MM diagnosis. These reports, however, are not homogenous in their sequencing

techniques – targeted next-generation sequencing (NGS), whole exome sequencing (WES), Sanger sequencing and array-based techniques – and often lack pre-AML/MDS BM, PB and germline DNA samples to enable adequate differentiation between acquired and germline single nucleotide variants (SNVs). Furthermore, few studies have assessed the genomic dynamics throughout the disease course, enabling proper characterization of clonal evolution.

Therefore, we aimed to describe the genomic landscape of three *RUNX1* FPDMM patients, from two different families who developed MM, with targeted NGS sequencing of DNA samples from BM, PB and buccal samples. We also conducted a systematic review of the literature for the published reports of sequencing findings on this patient population.

Materials and methods

Sequencing

We identified 5 patients from two different family pedigrees with *RUNX1* FPDMM who developed AML or MDS between 2000 and 2014. Three of these patients had DNA samples from BM and PB collected at the time of AML/MDS diagnosis and from buccal swab collected prior to or at AML/MDS diagnosis. DNA samples were sequenced as described below. All patients and/or their family members consented prior to study enrolment, according to our institutional board of ethics in research and under the principles of the Declaration of Helsinki.

DNA was extracted from mononuclear cells from BM, PB or from oral epithelial cells (OEpC) from saliva (collected with the Oragene®-DNA Kit, Ottawa, Canada). Barcoded libraries were prepared from extracted gDNA, profiling 48 recurrently mutated genes, using a custom, pan-myeloid, Ion Torrent AmpliSeq™ polymerase chain reaction (PCR) panel (Sekeres *et al*, 2017) (Table SI) (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) and Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (4475435; ThermoFisher Scientific). Variants were filtered to exclude University of California, Santa Cruz, common single nucleotide polymorphisms (UCSC Common SNPs) and non-exonic and synonymous variants, and to initially include only variants with an allele ratio of variant allele fractions 0.2–1.0 and a depth coverage of >25. Next, we searched for lower-frequency variants (variant allele fractions 0.02–0.19) reported in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC; <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) database and/or with Ion Reporter $P \leq 0.001$. Candidate variants were then visually inspected using the Integrative Genomics Viewer (IGV) (Broad Institute, Cambridge, MA, USA). Somatic variant calls were made (present or absent) with a minimum average depth of coverage of 500×. The lower limit of detection was estimated between variant allele fractions of 0.02–0.05.

All of the coding regions of *CDC25C* were sequenced by Sanger sequencing, except for Patient III-3 of Pedigree II, for whom no cDNA samples were available. This patient had

only exons 8 and 9 sequenced. Sanger sequencing was also performed on Patient III-5 BM transplant donor DNA sample for exon 11 of *TET2* and exon 17 of *CSFR3* to follow chimerism and polymorphisms uncovered by NGS (Table S2).

In order to determine whether somatic *RUNX1* variants were either in *cis* or *trans* we performed gene cloning assays with cDNA according to a standard technique (Maruyama *et al*, 2011), using the pGEM®-T Easy Vector Systems® (Promega, Madison, WI, USA) (Table S2).

Systematic review

We conducted a systematic review of the published reports of *RUNX1* FPDMM patients whose MM diagnosis DNA samples were sequenced. We searched the following databases: EMBASE, Scopus, MEDLINE via Pubmed, Cochrane Library and Web of Science. We used '*RUNX1*' and 'familial platelet disorders' as search terms and restricted our search to manuscripts in the English language, with full-text articles available, which reported on the results of DNA sequencing at a MM diagnosis with one of the following techniques: array-based, WES, whole genome and targeted NGS. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and conventional cytogenetics were also considered. We excluded patients with non-myeloid haematological malignancies and patients in whom sequencing was not performed at MM diagnosis. References of the identified articles were screened for additional reports. A flow-chart of the search process is available in Figure S1). All data regarding sequencing and the systematic review are available upon request.

Results

Figure 1 summarizes the pedigrees of both families. Patients' characteristics and a brief description of the germline *RUNX1* and somatic variants detected at MM diagnosis, with the supporting evidence of pathogenicity, according to the American College of Medical Genetics and Genomics (Richards *et al*, 2015), are shown in Table I.

Pedigree A

Patient I-2. Patient I-2 was diagnosed with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) at 57 years of age, and died shortly after, during induction chemotherapy. Flow cytometry performed in a BM sample at diagnosis showed expression of CD19 in 23.6%, CD7 in 77.6%, CD34 in 35.3% and HLA-DR in 62.8% of the analysed cells. CD10, CD3, CD33, CD14, CD13 and myeloperoxidase (MPO) were negative. This was interpreted as a very immature ALL, with no lineage assigned. Cytogenetics was not available. The patient was not known to have thrombocytopenia prior to her ALL diagnosis. DNA samples from this patient were not available for any analysis.

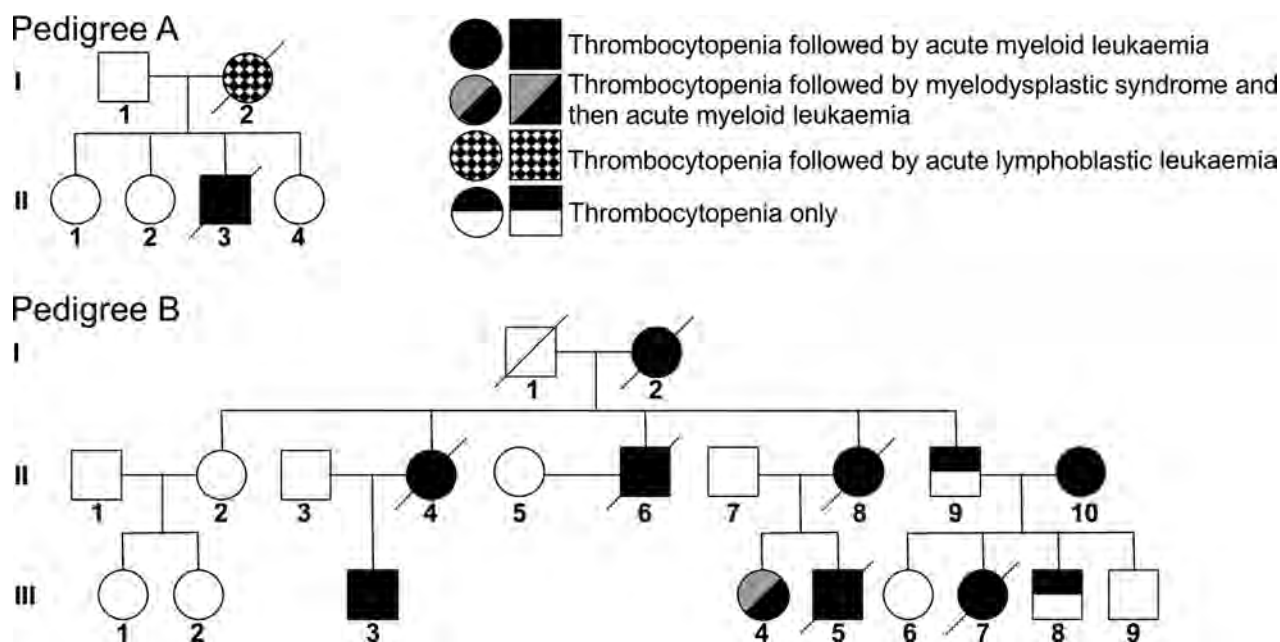


Fig 1. Pedigrees of the reported families with *RUNX1* familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancies (FPDMM). Pedigree A has a germline *RUNX1* R166X; pedigree B has a germline *RUNX1* R201X. Arrows indicate individuals who were sequenced at acute myeloid leukaemia/myelodysplastic syndrome diagnosis.

Patient II-3. Patient II-3, the son of Patient I-2, initially presented with a mild thrombocytopenia and a bleeding tendency (International Society for Thrombosis and Haemostasis bleeding assessment tool (Rodeghiero *et al*, 2010) score of 7) shortly after the death of his mother, in 2003. DNA samples from PB and buccal swab collected at this time were positive only for a *RUNX1* p.R166X variant. He was followed for 12 years, without worsening of symptoms or thrombocytopenia and no new cytopenias. On February 2015 he was diagnosed with a sigmoid colon adenocarcinoma, which was fully resected, without the need for adjuvant chemo- or radio-therapy. Three months later he presented with a new-onset pancytopenia, prompting BM evaluation, which showed 25-4% myeloblasts, confirming the diagnosis of AML. His BM cytogenetics showed a trisomy 2 in 15% of the metaphases. BM DNA sequencing at this time showed an additional *RUNX1* p. R204X, at a variant allele frequency (VAF) of 10-51% and an *NFE2* p.Q139fs at a VAF of 20-24% (Fig 2A and Table I). Through gene cloning, we determined that the somatic *RUNX1* p. R204X variant was in *trans* with the germline *RUNX1* p. R166X. Also, the *NFE2* p. Q139fs variant, which, to our knowledge has not been previously reported, was shown to be potentially pathogenic *in silico*, as assessed by the MutationTaster tool (Schwarz *et al*, 2010). He received standard induction chemotherapy with daunorubicin and cytarabine, followed by consolidation with high-dose cytarabine and went into remission. Sequencing of BM DNA collected after induction was positive only for the germline *RUNX1* mutation. The patient died shortly after

consolidation chemotherapy from relapsed colon adenocarcinoma metastatic to the liver.

Pedigree B

Patient III-4. Patient III-4 had been followed up for thrombocytopenia elsewhere for three years and presented to us in 2016 with an established MDS diagnosis. BM cytogenetics was normal, and she had no prior bleeding symptoms. Her family had an extensive history of thrombocytopenia and MM, with a previously established *RUNX1* FPDMM diagnosis [this pedigree has been previously described (Song *et al*, 1999)].

At MDS presentation, BM DNA sequencing showed a germline *RUNX1* p.R201X variant (confirmed on her OEPC DNA collected later, at AML diagnosis). She also had emerging *TET2* p.S471fs (VAF: 12-52%) and *NRAS* p.G12D (VAF: 5-23%) variants. She developed AML one year later, when the *NRAS* variant was only called in the PB (VAF: 5-81%), but not in her BM, which had an increase in the VAF of the *TET2* variant (38-5%; not called in the PB) and acquired two new variants: *IDH2* p.R140Q (VAF: 40-52%) and *STAG2* p.R1033X (VAF: 38-75%) (Fig 2B, Table I). Visual inspection in IGV revealed the AML-associated variants at <2% VAF in PB, and the *NRAS* variant <2% in BM, which is compatible with more than one clone and low AML blast count in PB. Her cytogenetics were still normal.

She underwent conventional induction chemotherapy and is currently recovering from a BM transplant (BMT) from an unrelated donor.

Table 1. Somatic variants, and their significance, identified by NGS in DNA samples from bone marrow from FPDMM individuals during follow-up

Pedigree	Patient	Germline <i>RUNX1</i> variant	Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Clinical significance	Clinical significance criteria	Variant allele frequency (%)		
								MDS	AML	COSMIC
A	II-3	c.496C>T p.R166X	<i>RUNX1</i>	c.610C>T	p.R204X	Pathogenic	PVS1; PS3	–	10-51	25124
			<i>NFE2</i>	c.415delC	p.Q139fs	Probably pathogenic	PVS1; PM2	–	20-24	–
B	III-4	c.601C>T p.R201X	<i>NRAS</i>	c.35G>A	p.G12D	Probably pathogenic	PS3; PM1; PM2; PP3	5-23	5-81 (PB)	564
			<i>TET2</i>	c.1411_1426 delAGCCCTTCTCCGATGC	p.S471fs	Pathogenic	PVS1; PM1 PM2	12-52	38-5	–
III-5			<i>STAG2</i>	c.3097C>T	p.R1033X	Probably pathogenic	PVS1; PM2	ND	38-75	1735710
			<i>IDH2</i>	c.419G>A	p.R140Q	Pathogenic	PS3; PM1; PM2; PP3	ND	40-52	41590
			<i>NRAS</i>	c.35G>A	p.G12D	Probably pathogenic	PS3; PM1; PM2; PP3	–	45-3	564
			<i>SRSF2</i>	c.284C>G	p.P95R	Uncertain significance	PM2; PP3	–	45-44	211661

AML, acute myeloid leukaemia; COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer; FPDMM, familial platelet disorders with predisposition to myeloid malignancies; MDS, myelodysplastic syndrome; ND, not detected; NGS, next-generation sequencing; PB, peripheral blood; PM1, and PM2, criteria 1 and 2 for moderate evidence of pathogenicity, according to the ACMG guidelines; PP1, 3 and 5; criteria 1, 3 and 5 for supporting evidence of pathogenicity, according to the ACMG guidelines; PS3, criterion 3 for strong evidence of pathogenicity, according to the ACMG guidelines; PVS1, criterion for very strong evidence of pathogenicity, according to the ACMG guidelines.

†Clinical significance criteria according to the 2015 ACMG standards and guidelines (Richards *et al*, 2015).

Patient III-5. Patient III-5 presented to us 2 years prior to his AML diagnosis, in 2014. He had mild thrombocytopenia without bleeding symptoms and episodes of transient non-specific migratory arthritis. His BM biopsy was remarkable only for dysmegakaryopoiesis, a consistent finding in FPDMM (Kanagal-Shamanna *et al*, 2017) and did not fulfill criteria for MDS. BM DNA collected at this time was positive for the same germline *RUNX1* p.R201X variant shared by his sister and an *SRSF2* p.P95R variant, at a VAF of 42.11%. DNA from OEPC was positive only for the *RUNX1* variant, confirming the somatic nature of the *SRSF2* variant.

In March 2016, he presented with a new-onset pancytopenia, with a hypocellular marrow with 48% of myeloblasts, establishing the diagnosis of AML. His cytogenetics was normal. At this time, his BM DNA had the same *SRSF2* p.P95R and a new *NRAS* p.G12D variant, at a VAF of 45.3%.

After diagnosis he received standard induction with daunorubicin and cytarabine, to which he was refractory, followed by re-induction with high-dose cytarabine and FLAG-Mito (fludarabine, cytarabine, and mitoxantrone). After three cycles of induction, he was in a morphological leukaemia-free state, without viable cytogenetics.

He then underwent a BMT with a matched unrelated donor about 6 months after his diagnosis, achieving complete remission. One year after his BMT he relapsed and then received 4 cycles of azacytidine, achieving a partial haematological remission, then receiving a second unrelated BMT from a different donor and dying shortly after from complications of the procedure. BM and PB DNA samples were available from relapse after his first BMT and prior to his second BMT.

Relapse samples showed the same *NRAS* and *SRSF2* variants, with new *CSF3R* and *TET2* variants, all with variant allele frequency (VAF) near 25%. He also showed a reduction in the VAF of his germline *RUNX1* variant. The reduction in VAF of both the previous AML and *RUNX1* germline mutations were considered secondary to mixed donor chimerism. Indeed, the new *CSF3R* and *TET2* variants are reported as rare non-pathogenic SNPs in the National Center for Biotechnology Information dbSNP database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) and probably arise from donor cells (Fig 2C, Table I). This was further confirmed through Sanger sequencing the DNA from his donor. After 4 cycles of azacytidine, prior to his second BMT, he maintained the same variants and rare SNP landscape. DNA samples from other members of this pedigree were not available for analysis.

Systematic review

Our systematic review led to the identification of 11 reports (Preudhomme *et al*, 2009; Shiba *et al*, 2012; Yoshimi *et al*, 2014; Churpek *et al*, 2015; Schmit *et al*, 2015; Antony-Debre *et al*, 2016; Haslam *et al*, 2016; Sakurai *et al*, 2016; Manchev *et al*, 2017; Tawana *et al*, 2017) of *RUNX1* FPDMM patients

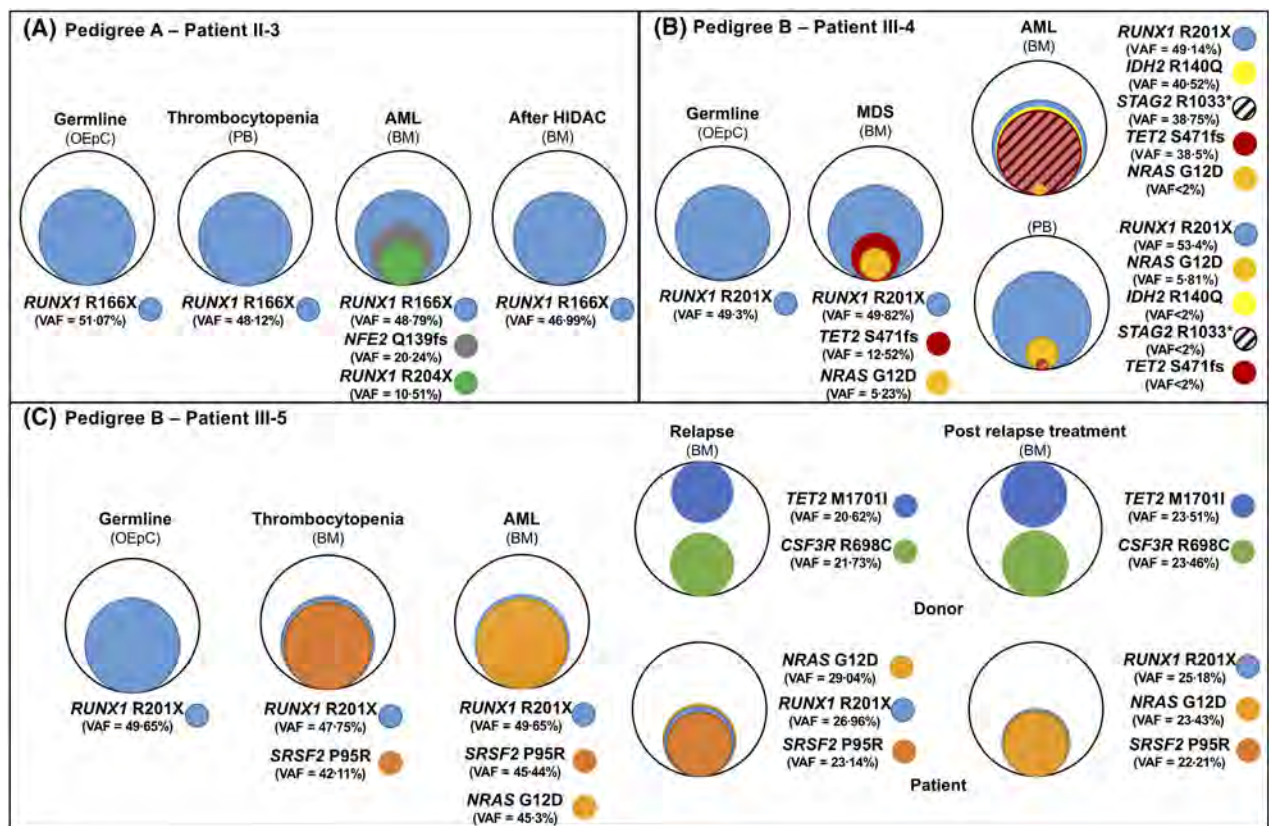


Fig 2. Diagram depicting the SNVs found at different time points (described below) for the reported patients. The circles are proportional to the variant allele frequency found for each mutation. Empty outer circles indicate a variant allele frequency of 100%. (A) Pedigree A – Patient II-3: DNA sequencing data from OEPC; from PB leucocytes when the patient had only thrombocytopenia, prior to development of AML; from BM leucocytes when the patient was diagnosed with AML and from BM leucocytes after the patient had been submitted to consolidation chemotherapy with HiDAC. (B) Pedigree A – Patient III-4: DNA sequencing results from OEPC; from PB leucocytes when the patient had only thrombocytopenia; from BM leucocytes at MDS diagnosis and from PB and BM leucocytes when the patient was diagnosed with AML. (C) Pedigree B – Patient III-5: DNA sequencing results from OEPC; from PB leucocytes when the patient had only thrombocytopenia, prior to development of AML; from BM leucocytes when the patient was diagnosed with AML; from BM leucocytes at relapse and post-relapse treatment. Mutations originating from the donor cells (confirmed through sequencing of his DNA) are shown above. AML, acute myeloid leukaemia; BM, bone marrow; HiDAC, high-dose cytarabine; MDS, myelodysplastic syndrome; PB, peripheral blood; OEPC, oral epithelial cells; SNVs, single nucleotide variants VAF, variant allele frequency.

who developed MM. We selected those that had FISH, conventional cytogenetics or sequencing (NGS, WES or Sanger) at the MM diagnosis. This led to the identification of 35 patients, whose findings, along with our 3 patients, are summarized in Figs 3 and 4.

The majority of these patients had AML (76.3%, 29/38), 17.2% (5/29) of which was secondary to either a previous cancer treatment ($n = 1$), myeloproliferative neoplasm ($n = 1$) or MDS ($n = 2$). The median age of MM diagnosis was 37 years old.

Two broad patterns of variants at MM diagnosis emerged from the analysis of these data: a) those with an additional somatic *RUNX1* (*sRUNX1*) abnormality with or without additional variants in genes recurrently mutated genes (RMG) in MM (Group 1: 44.7%, 17/38 patients); b) those without somatic abnormalities in genes other than *RUNX1* (no *sRUNX1*) (Group 2: 56.3%, 21/38 patients). These

patterns should, however, be interpreted carefully, given the limitations of comparing sequencing findings from several case reports, heterogeneous in both the scope and depth of the sequencing techniques employed. For instance, 4 patients in Group 2 did not have *RUNX1* sequenced at MM diagnosis. As a matter of fact, only two genes were sequenced through targeted NGS (Yoshimi *et al*, 2014) in these 4 patients. Furthermore, 5 patients in Group 1 were not submitted to WES, including three patients who had a limited number of genes submitted to Sanger sequencing (Antony-Debre *et al*, 2016) and only 3 patients in Group 2 were submitted to array or multiplex-based methods for investigation of *RUNX1* deletion (further details on the sequencing techniques of each study can be found in Table S2).

In Group 1, loss of the functional *RUNX1* allele occurred either by deletion (5.8%; 1/17), SNV (70.6%; 12/17) of the functioning allele or by duplication of the germline mutated

Group 1 - additional somatic <i>RUNX1</i> variants																	Group 2 - no additional somatic <i>RUNX1</i> variants																
Reference	7	7	20	7	22	7,20	11	20	7,20	7,20	20	20	13	13	12	20	1	1	1	1	15	12	*	20									
Patient number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24									
Diagnosis	AML	AML	AML	MDS	AML	AML	AML	AML	AML	AML	AML	AML	AML	AML	MDS	AML	AML	tAML	MDS	AML	AML	MDS	MDS	AML									
Age	25	55	25	18	12	45	37	42	60	36	5	56	48	12	31	51	43	44	63	55	49	37	61	27									
Germline <i>RUNX1</i>	MS	FS	MS	MS	del	MS	FS	MS	MS	FS	NS	NS	MS	FS	del	NS	FS	MS	del	NS	NS	FS	FS	FS									
Somatic <i>RUNX1</i>	FS	FS	MS	MS	+21q	del	+21q	MS	MS	NS	UPD	MS	MS	NS	+21q	del	NS																
Chromatin modifiers	ASXL1																																
	BCOR																																
	BCORL1																																
	EZH2																																
	KMT2D																																
DNA methylation	DNMT3A																																
	IDH1																																
	IDH2																																
	TET2																																
Cohesin	PDS5B																																
	RAD21																																
	STAG2																																
Splicing	SF3B1																																
	SRSF2																																
	U2AF1																																
	U2AF2																																
ZRSR2																																	
Signaling and kinase	CBL																																
	FLT3																																
	JAK2																																
	KRAS																																
	MPL																																
	NRAS																																
	PTPN11																																
Tf	GATA2																																
	CEBPA																																
	CREBBP																																
Tumour suppressors	CUX1																																
	LNK																																
	PHF6																																
	RB1																																
	TP53																																
	WT1																																
Others	CDC25C																																
	CDC27																																
	CDKN2A																																
	NFE2																																
	SAMD9																																
	5q- 7q-																																

Fig 3. Molecular characterization of myeloid malignancies occurring in patients with germline *RUNX1* mutations. Information on all these patients was retrieved through systematic review. Each column represents an individual patient. Patients are grouped in the columns according to proposed mechanisms of progression to myeloid malignancy (see text). Genes are grouped according to functional class in the rows. Blue squares indicate the presence of a single nucleotide variant. Red squares indicate the presence of a somatic alteration in *RUNX1*. Grey-patterned squares indicate genes that were not sequenced for the corresponding patient. Columns highlighted in yellow and marked by an asterisk in the top row indicate the patients from the present report. Genes in bold typeface indicate those mutated in more than three patients. AML, acute myeloid leukaemia; del, deletion of *RUNX1* (partial or complete deletion); FS, frameshift mutations; MDS, myelodysplastic syndromes; MF, myelofibrosis; MS, missense mutations; NS, nonsense mutations; tAML, therapy-related AML; UPD, uniparental disomy.

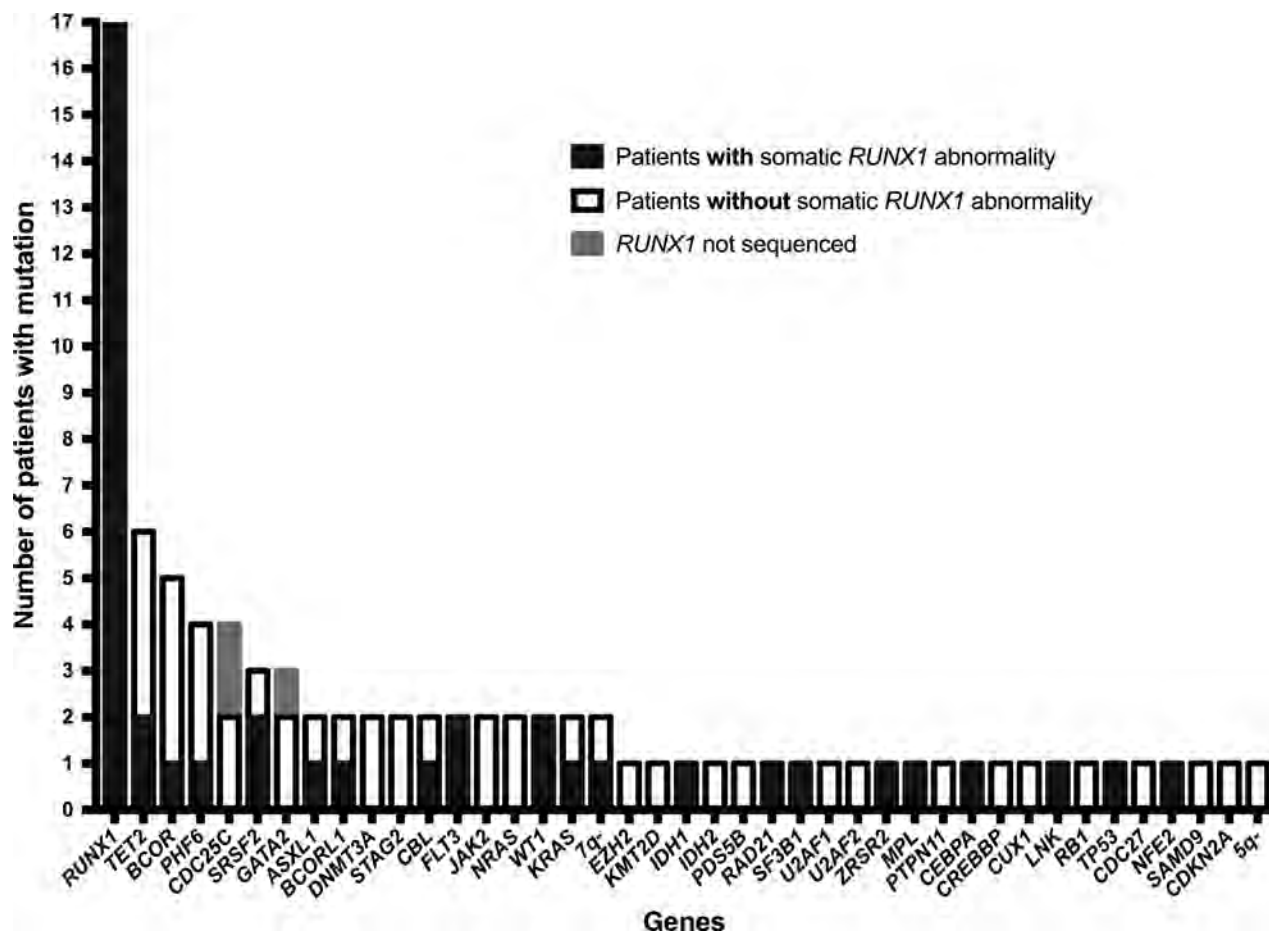


Fig 4. Distribution of mutated genes on patients with familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancies developing myeloid malignancies identified by a systematic review. Dark grey bars indicate variants/cytogenetic findings in patients with a somatic *RUNX1* abnormality, white bars indicate variants/cytogenetic findings in patients without a somatic *RUNX1* abnormality and light grey bars indicate patients where sequencing methods for detecting a somatic *RUNX1* abnormality were not available.

one (23.6%; 4/17). *RUNX1* SNVs/deletions were the only abnormality detected at MM diagnosis in 29.5% (5/17) of the patients. There was no correlation with the germline *RUNX1* variant and the pattern of variants found at MM diagnosis (with or without somatic abnormalities in *RUNX1*), except for the germline *RUNX1* R166X: Patient II-3 from Pedigree A in our report and the remaining two patients with this germline *RUNX1* variant from other reports (Haslam *et al*, 2016) (Patients 6, 12 and 16 in Fig 3) all had somatic *RUNX1* variants at AML/MDS.

In addition to *RUNX1*, *TET2*, *BCOR*, *PHF6*, *CDC25C*, *SRSF2* and *GATA2*, all had variants in in at least three patients each, being the most commonly altered genes at MM diagnosis. Together, variants in these genes were present in 56.7% (17/30) of the patients with an annotated variant. No clear pattern emerged between patients with (Group 1) and without (Group 2) additional *RUNX1* abnormalities (Fig 4). Regarding functional classes, genes in signalling and kinase pathways were more frequently mutated, but the numbers were too small to draw any significant conclusion.

It is important to note that variants in *CDC25C* were only reported by Yoshimi *et al* (2014), which could represent some form of geographic clustering.

Discussion

We have depicted the genomic landscape of three patients from two different families with *RUNX1* FPDMM who progressed to AML/MDS. This was characterized by the acquisition of somatic *RUNX1* alterations as well as variants in *NRAS* and *NFE2*, both of which had never been previously described in this setting. We have also reported one of the few instances of the progression of clonal haematopoiesis to *de novo* AML in a patient with *RUNX1* FPDMM.

RAS pathway genes *NRAS* and *KRAS* are frequently mutated in AML/MDS (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013, Lindsley *et al*, 2017). *NRAS*, however, has never been reported in association with MM transformation from *RUNX1* FPDMM. We were intrigued by the finding of the same *NRAS* variant in two siblings who shared the same

germline *RUNX1* variant, and hypothesized that this could be germline, but it was not called on DNA from buccal swab and the VAFs were lower than 50% in both patients. One could argue that the germline *RUNX1* p.R201X variant in this family predisposed to the development of the *NRAS* variant, or perhaps, more broadly, variants in signalling activation genes. Tawana *et al* (2017) analysed 3 patients with *RUNX1* p.R201X FPDMM and a *JAK2* 46/1 haplotype who developed AML/MDS, all of which had acquired *JAK2* and *SH2B3* abnormalities; both genes are related to signalling activation, but none of these patients harboured *NRAS* variants. It is possible that the *JAK2* 46/1 haplotype could have pushed for the development of *JAK2/SH2B3* abnormalities and that, in the absence of this haplotype, germline *RUNX1* p.R201X mutations could favour variants in signalling activation genes, such as *NRAS*, as reported here.

The *NFE2* p.Q139fs variant has not been previously reported either in COSMIC, the 1000 Genomes Project (The 1000 Genomes Project Consortium 2015) or in the Exome Aggregation Consortium (Lek *et al*, 2016) databases, but it is predicted to be pathogenic according to the MutationTaster[®] because it leads to a truncation in the protein. *NFE2* encodes an erythroid transcription factor that is targeted, among others, by *RUNX1* and plays an important role in platelet biogenesis, a process that is dysfunctional in patients with FPDMM (Glembotsky *et al*, 2014). It has been associated with haematological malignancies, mostly with myeloproliferative neoplasms, where it has been reported in about 1–2% of patients (Jutzi *et al*, 2013) and has recently emerged as an important hit in the development of polycythaemia vera (Grinfeld *et al*, 2018). It has never been reported in association with AML (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013) until recently, when Lazarevic *et al* (2018) described variants in *NFE2* in 4/6 patients with isolated myeloid sarcoma. Most of these variants (including those reported here) lead to a truncated protein, contrasting with the observation that *NFE2* overexpression is associated with both a myeloproliferative phenotype in animal models (Kaufmann *et al*, 2012) and the development of myeloid neoplasms in humans (Goerttler *et al*, 2005; Peeken *et al*, 2018). The findings by Jutzi *et al* (2013), however, support the role of the truncated *NFE2* protein in enhancing the wild-type protein function, which could explain the potential role of the *NFE2* variant in AML pathogenesis in our patient. The paucity of reports of this variant in association with AML, however, deserves further exploration.

Clonal haematopoiesis had previously been shown in *RUNX1* FPDMM (Churpek *et al*, 2015), where 80% of *RUNX1* FPDMM patients aged 50 years or less had clonal haematopoiesis without haematological malignancy. Yoshimi *et al* (2014) also reported clonal haematopoiesis in 50% of their cohort who had not developed haematological malignancies. These authors also documented clonal evolution from MDS and myelofibrosis to AML in two cases of their cohort. Sakurai *et al* (2016) found the same *TET2* and *KMT2A* variants in T cells and non-T cells from the PB of a

case of MDS from a *RUNX1*-mutated FPDMM patient. The VAF in T cells was much lower than in non-T cells, which suggests clonal evolution, but no pre-MDS DNA sample was available. Finally, Manchev *et al* (2017) detected a *TET2* p.P1962T variant in the DNA of CD34⁺ cells from a *RUNX1* FPDMM patient 5 years prior to the development of an ALL. This patient was diagnosed with treatment-related AML (tAML) two years after the ALL diagnosis and harboured a *TET2* p.P1962T variant at both the ALL and AML diagnoses, in addition to other acquired variants, documenting the role of clonal evolution in the setting of ALL emerging from FPDMM (Manchev *et al*, 2017). None of these reports, however, described the presence of the same somatic variants both before and at *de novo* myeloid malignancy diagnosis, as we found in Patient III-5 from Pedigree B.

Our systematic review enabled us to detect two patterns of genomic findings in *RUNX1* FPDMM at MM diagnosis (the presence or absence of s*RUNX1* abnormalities) that did not correlate with the germline *RUNX1* variant, except for the *RUNX1* p.R166X, which could indicate preferential pathways for MM development according to specific germline *RUNX1* variant and should be investigated in future studies. Also, the fact that 14.7% (5/34 patients with sequenced *RUNX1* at MM) of the patients had an additional somatic abnormality as the only finding at MM diagnosis raises the question of whether a somatic *RUNX1* alteration can, as a sole abnormality, lead to transformation in these patients. This question, as well as the role of variants in RMG in addition to somatic *RUNX1* abnormalities in the pathogenesis of MM, cannot be ascertained by these data, given the heterogeneous nature of the sequencing techniques among these reports, particularly the fact that not all patients had *RUNX1* deletions investigated or this gene sequenced at MM diagnosis.

The availability of germline DNA and longitudinal assessment of DNA samples from BM and PB, including those collected during remission, allowed us to confirm the somatic origin of the reported variants, presume their pathogenic role in MM development and capture AML transformation from clonal haematopoiesis. The analysis of these results in conjunction with a systematic review enabled us to better characterize the mechanisms of transformation in *RUNX1* FPDMM. Despite these strengths, our conclusions are limited by the small sample size, which can be expected in such a rare disease. Also, the use of a targeted gene-sequencing panel including 48 genes limits the scope of our findings, because we cannot entirely exclude the possibility of occurrence of variants in other genes that could have played a pathogenic role in the MM development and progression. The use of WES and array-based techniques for the investigation of *RUNX1* deletions could have expanded the scope of our findings, but we believe this would have a small impact given that the most commonly variant genes in myeloid neoplasms we analysed.

In conclusion, our findings help build the knowledge on the genetic basis of transformation of *RUNX1* FPDMM into

MM, which seems to occur by either a 'second hit' in the *RUNX1* gene (by either, deletion, uniparental disomy, duplication of the affected allele or SNV in the functional allele) or through the acquisition of SNV in RMG, most likely through a stage of clonal haematopoiesis. It is currently unclear whether patients with this second hit in *RUNX1* go through a period of clonal haematopoiesis and if they require additional SNVs in other genes to develop MM. Future research should focus on these issues and on the role of following these patients by periodic sequencing with customized NGS panels including at least *TET2*, *RUNX1*, *BCOR*, *GATA2* and *SRSF2*. The inclusion of *NFE2* in these panels might be warranted and extended to *de novo* AML without germline predisposition, given the uncertain role of this gene in AML pathogenesis and clinical presentation. The identification, through sequencing, of individuals at higher-risk of transformation could enable us to enact pre-emptive therapy.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant Number: 2014/00984-3 and from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001 to M. C. O., and from the Ontario Institute for Cancer Research and Southeastern Ontario Academic

Medical Organization to M. J. R. The authors also acknowledge the sequencing work of Drs. A. McNaughton and X. Liu at the Queen's Genomics Laboratory.

Author contributions

B. K. L. D., G. G. Y., L.H.S., B. S. and S. S. M. collected samples and performed experiments; M.J.R. and B. K. L. D. analysed the results. B. K. L. D. and G. G. Y. H. made the figures; B. K. L. D., G. G. Y. H., M. C. O., and M. J. R. designed the research. B. K. L. D. wrote the manuscript. G. G. Y. H., M. C. O., M. J. R. and F. F. C. reviewed the manuscript.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig S1. PRISMA Flow Diagram. **Table SI** List of genes sequenced using the custom Ion Torrent AmpliSeq™ panel. **Table SII** Primers used in Sanger Sequencing. **Table SIII** Patients, samples and sequencing strategies of the studies selected for the systematic review.

References

- Antony-Debre, I., Duployez, N., Bucci, M., Geffroy, S., Micol, J.B., Renneville, A., Boissel, N., Dhedin, N., Rea, D., Nelken, B., Berthon, C., Leblanc, T., Mozziconacci, M.J., Favier, R., Heller, P.G., Abdel-Wahab, O., Raslova, H., Latger-Cannard, V. & Preudhomme, C. (2016) Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **30**, 999–1002.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. & Vardiman, J.W. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, **127**, 2391–2405.
- Brown, A.L., Hahn, C.N., Carmichael, C., Wilkins, E., Babic, M., Chong, C.-E., Li, X.-C., Michaud, J., Cannon, P., Poplawski, N., Altree, M., Phillips, K., Jaensch, L., Fine, M., Schreiber, A.W., Feng, J., Rawlings, L., Vakulin, C., Butcher, C., D'Andrea, R., Lewis, I.D., Patton, N., Forsyth, C., Mapp, S., Mar Fan, H., Susman, R., Morgan, S., Cooney, J., Currie, M.S., Popat, U.R., Bradstock, K., Sorrell, A.D., Owen, C.J., Horwitz, M.S., Hiwase, D., Krämer, A., Fröhling, S., Godley, L.A., Churpek, J.E. & Scott, H.S. (2016) Expanded phenotypic and genetic heterogeneity in the clinical spectrum of FPD-AML: lymphoid malignancies and skin disorders are common features in carriers of germline *RUNX1* mutations. *Blood*, **128**, 1212.
- Churpek, J.E., Pyrtel, K., Kanchi, K.L., Shao, J., Koboldt, D., Miller, C.A., Shen, D., Fulton, R., O'Laughlin, M., Fronick, C., Pusic, I., Uy, G.L., Braunstein, E.M., Levis, M., Ross, J., Elliott, K., Heath, S., Jiang, A., Westervelt, P., DiPersio, J.F., Link, D.C., Walter, M.J., Welch, J., Wilson, R., Ley, T.J., Godley, L.A. & Grubert, T.A. (2015) Genomic analysis of germline and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood*, **126**, 2484–2490.
- Glembotsky, A.C., Bluteau, D., Espasandin, Y.R., Goette, N.P., Marta, R.F., Marin Oyarzun, C.P., Korin, L., Lev, P.R., Laguens, R.P., Molinas, F.C., Raslova, H. & Heller, P.G. (2014) Mechanisms underlying platelet function defect in a pedigree with familial platelet disorder with a predisposition to acute myelogenous leukemia: potential role for candidate *RUNX1* targets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **12**, 761–772.
- Goertler, P.S., Kreutz, C., Donauer, J., Faller, D., Maiwald, T., Marz, E., Rumberger, B., Sparna, T., Schmitt-Graff, A., Wilpert, J., Timmer, J., Walz, G. & Pahl, H.L. (2005) Gene expression profiling in polycythaemia vera: overexpression of transcription factor NF-E2. *British Journal of Haematology*, **129**, 138–150.
- Grinfeld, J., Nangalia, J., Baxter, E.J., Wedge, D.C., Angelopoulos, N., Cantrill, R., Godfrey, A.L., Papaemmanuil, E., Gundem, G., MacLean, C., Cook, J., O'Neil, L., O'Meara, S., Teague, J.W., Butler, A.P., Massie, C.E., Williams, N., Nice, F.L., Andersen, C.L., Hasselbalch, H.C., Guglielmelli, P., McMullin, M.F., Vannucchi, A.M., Harrison, C.N., Gerstung, M., Green, A.R. & Campbell, P.J. (2018) Classification and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, **379**, 1416–1430.
- Haslam, K., Langabeer, S.E., Hayat, A., Conneally, E. & Vandenberghe, E. (2016) Targeted next-generation sequencing of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, **175**, 161–163.
- Jutzi, J.S., Bogeska, R., Nikoloski, G., Schmid, C.A., Seeger, T.S., Stegelmann, F., Schwemmers, S., Grunder, A., Peeken, J.C., Gothwal, M., Wehrle, J., Aumann, K., Hamdi, K., Dierks, C., Kamar Wang, W., Dohner, K., Jansen, J.H. & Pahl, H.L. (2013) MPN patients harbor recurrent truncating mutations in transcription factor NF-E2. *Journal of Experimental Medicine*, **210**, 1003–1019.
- Kanagal-Shamanna, R., Loghavi, S., DiNardo, C.D., Medeiros, L.J., Garcia-Manero, G., Jabbour, E., Routbort, M.J., Luthra, R., Bueso-Ramos, C.E. & Khoury, J.D. (2017) Bone

- marrow pathologic abnormalities in familial platelet disorder with propensity for myeloid malignancy and germline RUNX1 mutation. *Haematologica*, **102**, 1661–1670.
- Kaufmann, K.B., Grunder, A., Hadlich, T., Wehrle, J., Gothwal, M., Bogeska, R., Seeger, T.S., Kayser, S., Pham, K.B., Jutzi, J.S., Ganzenmuller, L., Steinemann, D., Schlegelberger, B., Wagner, J.M., Jung, M., Will, B., Steidl, U., Aumann, K., Werner, M., Gunther, T., Schule, R., Rambaldi, A. & Pahl, H.L. (2012) A novel murine model of myeloproliferative disorders generated by overexpression of the transcription factor NF-E2. *Journal of Experimental Medicine*, **209**, 35–50.
- Latger-Cannard, V., Philippe, C., Bouquet, A., Baccini, V., Alessi, M.C., Ankri, A., Bauters, A., Bayart, S., Cornillet-Lefebvre, P., Daliphard, S., Mozziconacci, M.J., Renneville, A., Ballerini, P., Leverger, G., Sobol, H., Jonveaux, P., Preudhomme, C., Nurden, P., Lecompte, T. & Favier, R. (2016) Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **11**, 49.
- Lazarevic, V., Orsmark-Pietras, C., Lilljeborn, H., Pettersson, L., Rissler, M., Lubking, A., Ehinger, M., Juliusson, G. & Fioretos, T. (2018) Isolated myelosarcoma is characterized by recurrent NFE2 mutations and concurrent preleukemic clones in the bone marrow. *Blood*, **131**, 577–581.
- Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B., Tukiainen, T., Birnbaum, D.P., Kosmicki, J.A., Duncan, L.E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., Cooper, D.N., DeFlaux, N., DePristo, M., Do, R., Flannick, J., Fromer, M., Gauthier, L., Goldstein, J., Gupta, N., Howrigan, D., Kiezun, A., Kurki, M.I., Moonshine, A.L., Natarajan, P., Orozco, L., Peloso, G.M., Poplin, R., Rivas, M.A., Ruano-Rubio, V., Rose, S.A., Ruderfer, D.M., Shakir, K., Stenson, P.D., Stevens, C., Thomas, B.P., Tiao, G., Tusie-Luna, M.T., Weisburd, B., Won, H.H., Yu, D., Altshuler, D.M., Ardissono, D., Boehnke, M., Danesh, J., Donnelly, S., Elosua, R., Florez, J.C., Gabriel, S.B., Getz, G., Glatt, S.J., Hultman, C.M., Kathiresan, S., Laakso, M., McCarroll, S., McCarthy, M.I., McGovern, D., McPherson, R., Neale, B.M., Palotie, A., Purcell, S.M., Saleheen, D., Scharf, J.M., Sklar, P., Sullivan, P.F., Tuomilehto, J., Tsuang, M.T., Watkins, H.C., Wilson, J.G., Daly, M.J., MacArthur, D.G. & Exome Aggregation Consortium (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, **536**, 285–291.
- Liew, E. & Owen, C. (2011) Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica*, **96**, 1536–1542.
- Lindsley, R.C., Saber, W., Mar, B.G., Redd, R., Wang, T., Haagenson, M.D., Grauman, P.V., Hu, Z.H., Spellman, S.R., Lee, S.J., Verneris, M.R., Hsu, K., Fleischauer, K., Cutler, C., Antin, J.H., Neuberg, D. & Ebert, B.L. (2017) Prognostic mutations in myelodysplastic syndrome after stem-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*, **376**, 536–547.
- Manchev, V.T., Bouzid, H., Antony-Debre, I., Leite, B., Meurice, G., Droin, N., Prebet, T., Costello, R.T., Vainchenker, W., Plo, I., Diop, M., Macintyre, E., Asnafi, V., Favier, R., Baccini, V. & Raslova, H. (2017) Acquired TET2 mutation in one patient with familial platelet disorder with predisposition to AML led to the development of pre-leukaemic clone resulting in T2-ALL and AML-M0. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **21**, 1237–1242.
- Maruyama, A., Nishikawa, K., Kawatani, Y., Mimura, J., Hosoya, T., Harada, N., Yamamoto, M. & Itoh, K. (2011) The novel Nrf2-interacting factor KAP1 regulates susceptibility to oxidative stress by promoting the Nrf2-mediated cytoprotective response. *The Biochemical Journal*, **436**, 387–397.
- Michaud, J. (2002) In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*, **99**, 1364–1372.
- Ng, I.K., Lee, J., Ng, C., Kosmo, B., Chiu, L., Seah, E., Mok, M.M.H., Tan, K., Osato, M., Chng, W.J., Yan, B. & Tan, L.K. (2018) Preleukemic and second-hit mutational events in an acute myeloid leukemia patient with a novel germline RUNX1 mutation. *Biomarker Research*, **6**, 16.
- Owen, C.J., Toze, C.L., Koochin, A., Forrest, D.L., Smith, C.A., Stevens, J.M., Jackson, S.C., Poon, M.C., Sinclair, G.D., Leber, B., Johnson, P.R., Macheta, A., Yin, J.A., Barnett, M.J., Lister, T.A. & Fitzgibbon, J. (2008) Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood*, **112**, 4639–4645.
- Peeken, J.C., Jutzi, J.S., Wehrle, J., Koellerer, C., Staehle, H.F., Becker, H., Schoenwandt, E., Seeger, T.S., Schanne, D.H., Gothwal, M., Ott, C.J., Grunder, A. & Pahl, H.L. (2018) Epigenetic regulation of NFE2 overexpression in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **131**, 2065–2073.
- Preudhomme, C., Renneville, A., Bourdon, V., Philippe, N., Roche-Lestienne, C., Boissel, N., Dheudin, N., Andre, J.M., Cornillet-Lefebvre, P., Baruchel, A., Mozziconacci, M.J. & Sobol, H. (2009) High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood*, **113**, 5583–5587.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K. & Rehm, H.L. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, **17**, 405–424.
- Rodeghiero, F., Tosetto, A., Abshire, T., Arnold, D.M., Collier, B., James, P., Neunert, C. & Lillcrap, D. (2010) ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **8**, 2063–2065.
- Sakurai, M., Kasahara, H., Yoshida, K., Yoshimi, A., Kunimoto, H., Watanabe, N., Shiraiishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Harada, Y., Harada, H., Kawakita, T., Kurokawa, M., Miyano, S., Takahashi, S., Ogawa, S., Okamoto, S. & Nakajima, H. (2016) Genetic basis of myeloid transformation in familial platelet disorder/acute myeloid leukemia patients with haploinsufficient RUNX1 allele. *Blood Cancer Journal*, **6**, e392.
- Schmit, J.M., Turner, D.J., Hromas, R.A., Wingard, J.R., Brown, R.A., Li, Y., Li, M.M., Slayton, W.B. & Cogle, C.R. (2015) Two novel RUNX1 mutations in a patient with congenital thrombocytopenia that evolved into a high grade myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research Reports*, **4**, 24–27.
- Schwarz, J.M., Rodelsperger, C., Schuelke, M. & Seelow, D. (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods*, **7**, 575–576.
- Sekeres, M.A., Othus, M., List, A.F., Odenike, O., Stone, R.M., Gore, S.D., Litzow, M.R., Buckstein, R., Fang, M., Roulston, D., Bloomfield, C.D., Moseley, A., Nazha, A., Zhang, Y., Velasco, M.R., Gaur, R., Atallah, E., Attar, E.C., Cook, E.K., Cull, A.H., Rauh, M.J., Appelbaum, F.R. & Erba, H.P. (2017) Randomized phase II study of azacitidine alone or in combination with lenalidomide or with vorinostat in higher-risk myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia: North American Intergroup Study SWOG S1117. *Journal of Clinical Oncology*, **35**, 2745–2753.
- Shiba, N., Hasegawa, D., Park, M., Murata, C., Sato-Otsubo, A., Ogawa, C., Manabe, A., Arakawa, H., Ogawa, S. & Hayashi, Y. (2012) CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia (FPD/AML). *Blood*, **119**, 2612–2614.
- Song, W.J., Sullivan, M.G., Legare, R.D., Hutchings, S., Tan, X., Kufrin, R., Ratajczak, J., Resende, I.C., Haworth, C., Hock, R., Loh, M., Felix, C., Roy, D.C., Busque, L., Kurnit, D., Willman, C., Gewirtz, A.M., Speck, N.A., Bushweller, J.H., Li, F.P., Gardiner, K., Poncz, M., Maris, J.M. & Gilliland, D.G. (1999) Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature Genetics*, **23**, 166–175.
- Tawana, K., Wang, J., Kiraly, P.A., Kallay, K., Benyo, G., Zombori, M., Csomor, J., Al Seraihi, A., Rio-Machin, A., Matolcsy, A., Chelala, C., Cavenagh, J., Fitzgibbon, J. & Bodor, C. (2017) Recurrent somatic JAK-STAT pathway variants within a RUNX1-mutated pedigree. *European Journal of Human Genetics*, **25**, 1020–1024.

- The 1000 Genomes Project Consortium (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature*, **526**, 68–74.
- The Cancer Genome Atlas Research Network (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, **368**, 2059–2074.
- Yoshimi, A., Toya, T., Kawazu, M., Ueno, T., Tsukamoto, A., Iizuka, H., Nakagawa, M., Nannya, Y., Arai, S., Harada, H., Usuki, K., Hayashi, Y., Ito, E., Kirito, K., Nakajima, H., Ichikawa, M., Mano, H. & Kurokawa, M. (2014) Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nature Communications*, **5**, 4770.

Support information

Table S1 – List of genes sequenced using the custom Ion Torrent AmpliSeq™ panel

<i>ASXL1</i>	<i>CEBPA</i>	<i>GATA2</i>	<i>KRAS</i>	<i>RAD21</i>	<i>SRSF2</i>
<i>BCOR</i>	<i>CSF3R</i>	<i>GNAS</i>	<i>MPL</i>	<i>RIT1</i>	<i>STAG2</i>
<i>BCORL1</i>	<i>CUX1</i>	<i>GNB1</i>	<i>NF1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TET2</i>
<i>BOD1L</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>IDH1</i>	<i>NFE2</i>	<i>STEBP1</i>	<i>TLR2</i>
<i>BRAF</i>	<i>ETV6</i>	<i>IDH2</i>	<i>NPM1</i>	<i>SF3B1</i>	<i>TP53</i>
<i>BRCC3</i>	<i>EZH2</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SH2B3</i>	<i>U2AF1</i>
<i>CALR</i>	<i>FLT3</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PHF6</i>	<i>SMC1A</i>	<i>WT1</i>
<i>CBL</i>	<i>GATA1</i>	<i>KIT</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SMC3</i>	<i>ZRSR2</i>

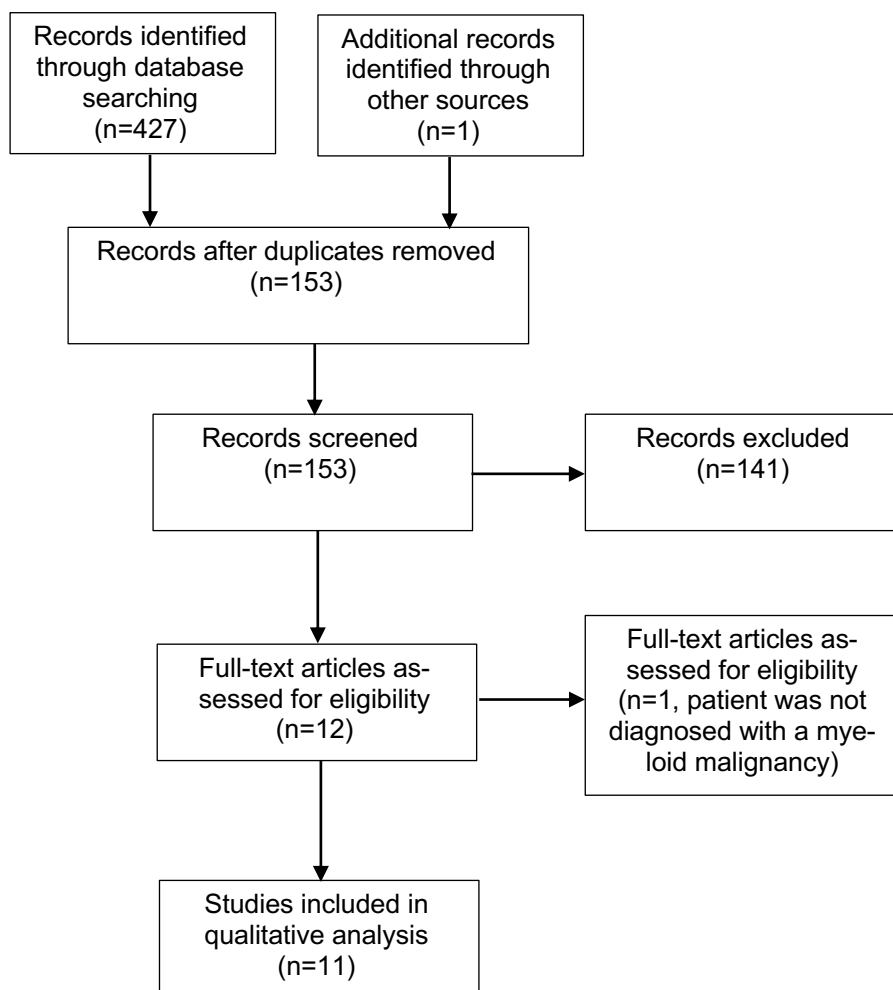
Figure S1 – PRISMA Flow Diagram

Table S2 – Primers used in Sanger Sequencing

Genes	Fragment/exon	Forward	Reverse
CDC25C	Fragment 1	5'GCGGCTGTTGATATTCTTGCTC 3'	5'GGGTTCTCCAGACAAAATGC3'
	Fragment 2	5'GCATTTTGTCTGGAGGAACCC 3'	5'CACTTCTGCTCACCTTTGCTTC3'
	Fragment 3	5'GAAGCAAAGGTGAGCAGAAGTGG3'	5'CAGACAGCGGCACATTGCGGG3'
	Fragment 4	5'GTATGTCAACCCAGAAACAGTG 3'	5'GGTTTCTGCAGTGTCTTTTGGTG 3'
CDC25C exons 8, 9	Exon 8	5' TGGCCTAACATCTGGAACCTG 3'	5'GGGAAGACGGTATGATGACAAC 3'
	Exon 9	5'AGCCTTTGTCCTTTACCCCTCCC 3'	5' ACCAGGCATTCTCGGCAAACAG 3'
CSF3R	Exon 17	5' TGAGGAACATACTAGTGCTTTGC 3'	5' CACCGGCTTCTTTTCATCCTCC 3'
RUNX1 (cDNA)	Exons 4 and 5	5' TGGCTGGCAATGATGAAAACCTAC 3'	5' GTTAAAGGCAGTGGAGTGGTTC 3'
TET2	Exon 11	5' GCAATGGAAACCTATCAGTGAC 3'	5' GGATTCTTTAAAGGGGTTGTGGC 3'

Table S3 – Patients, samples and sequencing strategies of the studies selected for the systematic review

	Population	Samples	Sequencing methods
Reference 1: Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi KL, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> . 2015;126(22):2484-2490.	71 individuals from 21 families with known myeloid malignancies predisposition syndromes. 5 of these families had germline <i>RUNX1</i> mutations, encompassing 15 patients, 5 among which had been diagnosed with AML/MDS and had DNA available for sequencing	Bone marrow, peripheral blood and nonmalignant tissue (skin biopsy or buccal swab) collected at AML/MDS diagnosis	Targeted exome sequencing of the 264 recurrently mutated genes (genes mutated in at least 2 of the 200 patients sequenced by The Cancer Genome Atlas Research Network)
Reference 7: Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, et al. High frequency of <i>RUNX1</i> biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. <i>Blood</i> . 2009;113(22):5583-5587	15 patients from 4 pedigrees with <i>RUNX1</i> FPDMM, 7 among which developed AML (one treatment-related for a prior ALL) and had DNA available for sequencing.	Bone marrow samples collected at AML/MDS diagnosis	FISH for <i>RUNX1</i> , CGH array and sequencing of <i>RUNX1</i> (exons 3 through 8), <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>FLT3</i> , <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> and <i>c-KIT</i> .
Reference 9: Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, et al. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. <i>Nat Commun</i> . 2014;5:4770.	13 patients from 7 pedigrees were diagnosed with <i>RUNX1</i> FPDMM after screening of 73 patients with hereditary thrombocytopenia. 6 of these patients developed AML/MDS/PMF and had DNA available for sequencing.	Peripheral blood and buccal swab samples collected at AML/MDS/PMF diagnosis	Synchronized quantitative-PCR and single-nucleotide polymorphism sequencing for evaluation of <i>RUNX1</i> LOH. Whole-exome sequencing in two patients (one with MDS and the other with PMF) in both tumor/normal DNA samples. The remaining 4 patients underwent deep-sequencing for <i>CDC25C</i> as well as <i>GATA2</i> .
Reference 11: Haslam K, Langabeer SE, Hayat A, Conneally E, Vandenberghe E. Targeted next-generation sequencing of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukaemia. <i>Br J Haematol</i> . 2016;175(1):161-163.	2 patients from the same pedigree of <i>RUNX1</i> FPDMM diagnosed with AML with myelodysplastic features with DNA available for sequencing.	Bone marrow samples collected at AML diagnosis.	Targeted NGS of the entire coding regions of <i>DNMT3A</i> , <i>CEBPA</i> , <i>GATA2</i> , <i>TET2</i> , <i>TP53</i> and mutational hotspots of <i>ASXL1</i> , <i>BRAF</i> , <i>CBL</i> , <i>FLT3</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>JAK2</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>NPM1</i> , <i>NRAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RUNX1</i> and <i>WT1</i> . <i>CDC25C</i> exon 8 was sequenced through Sanger sequencing.
Reference 12: Sakurai M, Kasahara H, Yoshida K, et al. Genetic basis of myeloid transformation in familial platelet disorder/acute myeloid	2 patients from 2 different pedigrees with <i>RUNX1</i> FPDMM, among which developed PMF and the other MDS,	Bone marrow samples collected at PMF/MDS diagnosis	Whole-exome sequencing of DNA from T cells and non-T cells of the patient's peripheral blood in one case and whole-exome sequencing with

leukemia patients with haploinsufficient RUNX1 allele. <i>Blood Cancer J.</i> 2016;6:e392.	both with available DNA for sequencing.	Fibroblasts, CD34+ cells and peripheral blood mononuclear and bone marrow. Peripheral CD34+ cells were collected five years prior to the ALL diagnosis, the remainder at the diagnosis of both ALL and AML.	FISH in mononuclear cells from bone marrow in the other
Reference 13: Manchev VT, Bouzid H, Antony-Debre I, et al. Acquired TET2 mutation in one patient with familial platelet disorder with predisposition to AML led to the development of pre-leukaemic clone resulting in T2-ALL and AML-M0. <i>J Cell Mol Med.</i> 2017;21(6):1237-1242.	1 patient from a single pedigree with RUNX1 FPDMM who developed ALL, and later developed treatment-related AML and had DNA available for sequencing.		Targeted NGS (NOTCH1 (indel) PHF6, STAT5B, IRS4, HCFC1, CXCR4, JAK3, URB1, JAK1, PCNXL2, ASXL1, PPP2R2B, NRF1, SUDS3, DACT2, SULF1, CTNND2, MYO1D, PTPN13, TET2, EZH2, NR2F2, PCDHAC1, MSRB2, NCAN, VEPH1, OPRD1, SAP130, SLCO4C1, GGT1, EPHA10, NOTCH1-bis (K1488N), SPEG, LRTM2 on CD34+ cells 5 years prior to the ALL diagnosis. Targeted NGS with the same panel was also performed at ALL and AML diagnosis in bone marrow samples. CGH array was performed in bone marrow samples in the same timepoints (ALL and AML diagnosis).
Reference 14: Tawana K, Wang J, Kiraly PA, et al. Recurrent somatic JAK-STAT pathway variants within a RUNX1-mutated pedigree. <i>Eur J Hum Genet.</i> 2017;25(8):1020-1024.	5 patients from the same pedigree with RUNX1 FPDMM, 3 among which developed AML/MDS and had DNA available for sequencing.	Bone marrow and peripheral blood samples collected at MDS/AML diagnosis	Whole-exome sequencing of DNA extracted from leukocytes isolated from bone marrow and peripheral blood. Copy number alterations were detected through combined analysis of the whole-exome sequencing results from the three patients and their parents.
Reference 15: Ng IK, Lee J, Ng C, et al. Preleukemic and second-hit mutational events in an acute myeloid leukemia patient with a novel germline RUNX1 mutation. <i>Biomark Res.</i> 2018;6:16.	5 patients from the same pedigree with RUNX1 FPDMM, one among which developed AML and had DNA available for sequencing.	Bone marrow and peripheral blood samples collected at the diagnosis, post-induction therapy and post-haploidentical stem cell transplantation.	Targeted NGS in 54 genes commonly associated with myeloid malignancies: ABL1, ASXL1, ATRX, BCOR, BCORL1, BRAF, CALR, CBL, CBLB, CBLC, CDKN2A, CE-BPA, CSF3R, CUX1, DNMT3A, ETV6, EZH2, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, JAK2, JAK3, KDM6A, KIT, KMT2A, KRAS, MPL, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PHF6, PTEN, PTPN11, RAD21,

				<i>RUNX1, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1 and ZRSR2.</i>
Reference 20: Antony-Debre I, Du-ployez N, Bucci M, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. <i>Leukemia</i> . 2016;30(4):999-1002.	25 individuals from 15 <i>RUNX1</i> FPDMM pedigrees, 11 among which developed AML. 9 of these patients had DNA available for sequencing.(5 previously reported by Preudhomme et al.)	Bone marrow or peripheral blood samples collected at AML diagnosis	Targeted NGS including the entire coding region of <i>ASXL1, ASXL2, CDC25C, BCOR, BCORL1, BRAF, CSF3R, CALR, CBL, CEBPA, DNMT3A, ETV6, EZH2, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MPL, NIPBL, NPM1, NOTCH1, NRAS, PHF6, PTEN, PTPN11, RAD21, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1</i> and <i>ZRSR2</i> . Two patients were also submitted to CGH array.	
Reference 21: Shiba N, Hasegawa D, Park M, et al. CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia (FPD/AML). <i>Blood</i> . 2012;119(11):2612-2614	3 patients from the same pedigree with <i>RUNX1</i> FPDMM, 1 among which developed CMMML and had DNA available for sequencing.	Peripheral blood samples collected at CMMML diagnosis	Sanger sequencing of exons 8-9 of the CBL gene. <i>FLT3, KIT, RAS, JAK2, PTPN11, ASXL1, IDH1/2</i> , and <i>MPL</i> were also sequenced by Sanger. An Affymetrix GeneChip 250K was used to detect copy number abnormalities.	
Reference 22: Schmit JM, Turner DJ, Hromas RA, et al. Two novel <i>RUNX1</i> mutations in a patient with congenital thrombocytopenia that evolved into a high-grade myelodysplastic syndrome. <i>Leukemia Research Reports</i> . 2015;4(1):24-27	1 patient with a lifelong history of thrombocytopenia and no known family history of <i>RUNX1</i> FPDMM (later confirmed by sequencing) who developed MDS and had DNA available for sequencing.	Peripheral blood and buccal swab samples collected at the MDS diagnosis	Sanger sequencing of the <i>RUNX1</i> gene at diagnosis of MDS.	

Abbreviations: ALL: acute lymphoblastic leukemia; AML: acute myeloid leukemia; CGH: comparative genome hybridization; CMMML: chronic myelomonocytic leukemia; FISH: fluorescent *in situ* hybridization; FPDMM: familial platelet disorders with myeloid malignancies; LOH: loss of heterozygosity; MDS: myelodysplastic syndrome; NGS: next-generation sequencing; PMF: primary myelofibrosis.

1 **ADAM17 expression correlates with the increased adhesion of red blood**
2 **cells to endothelial colony-forming cells lacking *JAK2V617F* in patients**
3 **with myeloproliferative neoplasms**

4 Bruno K L Duarte,^{1,2} Stephanie Ospina-Prieto^{1,2}, Lúcia H Siqueira², Jéssica O Frade^{1,2},
5 Lauanda O S Monteiro², Priscilla E Soares², Gabriela G Yamaguti-Hayakawa^{1,2}, Michael J
6 Rauh³, Fernando F Costa^{1,2}, and Margareth C Ozelo^{1,2}

7 ¹INCT do Sangue, Hemocentro UNICAMP, University of Campinas, SP, Brazil

8 ²Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas,
9 FCM UNICAMP, Campinas, SP Brazil

10 ³Department of Pathology and Molecular Medicine at Queen's University, Kingston, ON,
11 Canada

12 Running title: ADAM17 expression in *JAK2V617F*⁻ ECFCs

13 Total word count (without references): 3877

14 Abstract word count: 238

15 Number of Figures: 3

16 Number of Tables: 4

17 Number of references: 42

18

19 **Keypoints**

20 ECFCs from *JAK2V617F*⁺ MPN patients have an increased adhesion to RBCs despite the
21 lack of the disease-specific mutation.

22 *ADAM17* expression in the *JAK2V617F*⁻ ECFCs correlates with the increased adhesiveness
23 and is elevated in the plasma of *JAK2V617F*⁺ MPN patients.

24 Abstract

25 *JAK2V617F* mutation is a well-known risk factor for the occurrence of thrombosis in
26 myeloproliferative (MPN) patients. Despite results from animal and *in vitro* models of a
27 *JAK2V617F*⁺ endothelium showing a pro-adhesive, prothrombotic phenotype, whether and
28 how a *JAK2V617F*⁺ mutated endothelium influences the risk of thrombosis in MPN patients
29 is still unanswered. Here, we isolated endothelial colony-forming cells (ECFCs), an endo-
30 thelial progenitor capable of producing mature endothelial progeny, from nine *JAK2V617F*⁺
31 MPN patients and used next-generation sequencing to test whether ECFCs express
32 *JAK2V617F*. We also evaluated the adhesion of ECFCs to red blood cells (RBCs) from
33 healthy individuals, their angiogenesis capacity through culture in Matrigel™ and their mi-
34 gration capacity through a wound-healing assay in comparison with ECFCs from controls.
35 *JAK2V617F*⁺ MPN ECFCs did not harbor *JAK2V617F* but had a higher adhesion to RBCs
36 and lower angiogenesis and migration capacity. Gene expression analysis showed a higher
37 expression of *ADAM17* (Fold change: 5.77, P=0.003), a metalloprotease involved in the
38 shedding of several membrane-bound proteins, such as adhesion molecules and pro-in-
39 flammatory cytokines. Plasma levels of ADAM17 were found to be elevated in 44 MPN pa-
40 tients in comparison with 27 healthy individuals (median 173.9 pg/ml vs. 71.44 pg/ml,
41 P=0.0116), a difference that seems to be related to *JAK2V617F* (median 294.7 pg/ml for
42 *JAK2V617F*⁺ vs. 79.99 pg/ml for *JAK2V617F* patients⁻, P=0.0342). These findings highlight
43 the presence of a pro-adhesive phenotype of MPN ECFCs not dependent on *JAK2V617F*
44 and possibly related to ADAM17.

45 Introduction

46 Thrombosis is a major determinant of morbidity and mortality in *BCR-ABL1*-negative
47 myeloproliferative neoplasms (MPN)(109). Though several factors have been identified as
48 determinants of this complication, the *JAK2V617F* mutation seems to be a major contributor

49 to the occurrence of these events in MPN patients(116). The exact mechanisms by which
50 this mutation increases the thrombotic risk of MPN patients has been the focus of intense
51 research.

52 Recent publications using animal and *in vitro* models have depicted different consequences
53 of the expression of *JAK2V617F* in endothelial cells (ECs), such as increased adhesiveness
54 to leukocytes mediated by a higher expression of P-selectin and promotion of clonal expan-
55 sion through the vascular component of the bone marrow niche(123, 125, 164). However,
56 whether ECs from MPN patients express *JAK2V617F* has been a matter of debate over the
57 years.

58 Though the presence of *JAK2V617F* has been described in several candidate human endo-
59 thelial progenitor cells (EPCs), such as myeloid angiogenic cells (formerly known as CFU-
60 EC), these have not been shown to have a true endothelial nature, given their lack of *in vivo*
61 angiogenesis capacity, clonal proliferation and expression of hematopoietic antigens, such
62 as CD45 and CD14(131, 133, 165). For these reasons, endothelial colony-forming cells
63 (ECFCs), a circulating endothelial progenitor cell (EPC) capable of clonal proliferation re-
64 sulting in functional endothelial progeny, has been the most used EC for this purpose.

65 Initial findings on the *JAK2V617F* expression in ECFCs were contradictory(132, 135, 165)
66 and definitive proof of the presence of this mutation in ECs came from the work by Sozer *et*
67 *al.*(138) and Rosti *et al.*(137), who were able to detect it in ECs derived from the hepatic and
68 splenic veins, from specimens obtained through laser microdissection of MPN patients who
69 underwent splenectomy. These, however, were detected in about 60% of the *JAK2V617F*⁺
70 MPN patients, ranging from 16 to 100% of the analyzed cells, depending on the topography
71 (i.e.: splenic vein vs. splenic capillaries) and were not detected in spleen-derived ECFCs.
72 This heterogeneity raises the question of whether the pro adhesive phenotype usually

73 attributed to the *JAK2V617F*⁺ ECs is present in ECs lacking this mutation, and if not
74 *JAK2V617F*, what drives it.

75 Furthermore, experimental models of *JAK2V617F*⁺ ECs have only evaluated the adhesion
76 of these cells to leukocytes. An elevated hematocrit is an important factor in the development
77 of thrombosis in MPN patients^(111, 112), with red blood cells (RBCs) from these patients show-
78 ing a higher adhesion to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) than RBCs from
79 healthy individuals^(118, 119). Whether ECs from MPN patients are more adherent to RBCs
80 than ECs from healthy individuals has not been evaluated.

81 Here, we report the increased adhesiveness of RBCs from healthy individuals to ECFCs
82 from *JAK2V617F*⁺ MPN patients lacking this mutation, which was assessed by next-gener-
83 ation sequencing (NGS). We show that this phenotype is related to a higher expression of
84 ADAM17, a proinflammatory metalloprotease involved in the shedding of multiple proteins,
85 which was also elevated in the plasma of these patients.

86 **Methods**

87 **Subjects**

88 We randomly selected 20 patients with *BCR-ABL1*-negative MPN, diagnosed and followed-
89 up at our institution, for ECFC isolation (ECFC cohort) between January 2014 and July 2019.
90 Patients had to be *JAK2V617F*⁺. MPN diagnosis was established as per WHO 2016 crite-
91 ria(166). We did not exclude patients undergoing treatment with hydroxyurea, but we did not
92 include patients using JAK2 inhibitors or in clinical trials. We also collected blood from 14
93 healthy volunteers for ECFC isolation to serve as controls.

94 We recruited an additional 91 *BCR-ABL1* negative MPN patients for the determination of
95 plasma levels of cytokines, coagulation proteins and adhesion molecules. These patients
96 were selected regardless of their time from diagnosis, *JAK2V617F* mutation status and prior

97 treatments, except for the use of JAK2 inhibitors and participation in clinical trials. Blood
98 from 37 healthy volunteers was also collected as controls. Of these patients, only 44 with
99 MPN and 27 healthy volunteers were available for ADAM17 measurements.

100 The study protocol was in accordance with the Helsinki Declaration and was approved by
101 our Institution's ethical committee. All study participants gave their written informed consent
102 prior to study entry.

103 **ECFC isolation**

104 ECFC cultures were obtained according to the protocol first described by Lin *et al.*(130) with
105 modifications by Sakamoto *et al.*(159). Blood (45 ml) from *JAK2V617F* MPN patients and
106 healthy volunteers was collected in tubes with sodium heparin (BD Vacutainer®, Becton,
107 Dickinson and Company, San Jose, CA) and processed immediately. Samples overlaid onto
108 Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) were centrifuged at 317 *g* for 30
109 minutes at room temperature. Buffy coat mononuclear cells (MNC) were removed and
110 washed in PBS and then in Endothelial Basal Media (EBM-2, Lonza, Walkersville, MD).

111 Approximately 1×10^7 MNCs were plated onto collagen-coated (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich,
112 Saint Louis, MO) 12-well plates with EBM-2 supplemented medium. Cells were incubated
113 at 37°C with 5% CO₂. Non-adherent cells were removed after 24 hours; culture media was
114 exchanged daily for the first 7 days and every two days thereafter.

115 ECFC colonies were observed between 9 and 21 days of culture as a monolayer with cob-
116 blestone morphology.

117 The endothelial nature of ECFCs was assessed after third passage, by fluorescence-acti-
118 vated flow cytometry using anti-CD31-FITC, clone MBC 78.2 (Invitrogen, Camarillo, CA),
119 anti-CD144-PE, clone TEA 1/31 (Beckman Coulter, Marseille, France); anti-CD146-PE,
120 clone 128018 (R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-VEGF R2/KDR-PE, clone 89106 (R&D

121 Systems, Minneapolis, MN), anti-CD34-FITC, clone My10 (BD, San Jose, CA), anti-CD45-
 122 PerCP, clone 2D1 (BD, San Jose, CA) and anti-CD133-APC, clone AC133 (Milteny, Biotech,
 123 Auburn, CA) analyzed in a BD FACS Calibur, with the software BD FACS DIVA 7.0 (BD,
 124 San Jose, CA).

125 ***JAK2V617F* mutation assessment**

126 DNA was extracted from ECFCs after the third passage, after immunophenotyping, and from
 127 patients' granulocytes, at diagnosis. *JAK2V617F* mutation status was determined in DNA
 128 from both granulocytes and ECFCs by three different techniques: restriction fragment length
 129 polymorphism (RFLP-PCR); real-time quantitative PCR (RQ-PCR) and NGS with the Ion-
 130 Torrent platform (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). The latter was also used for the
 131 assessment of the granulocyte *JAK2V617F* allele burden and any non-*JAK2* mutations
 132 shared between ECFCs and granulocytes.

133 RQ-PCR consisted of a TaqMan-based method (Applied Biosystems, Thermo Fisher, CA)
 134 (Table S1) and RFLP-PCR was done as previously reported(167) (Table S2). NGS con-
 135 sisted of a 48-recurrently mutated gene panel profiling 589 coding regions (Table S3) using
 136 a custom, pan-myeloid, IonTorrent AmpliSeq™ (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).
 137 Sequencing data analysis was done as previously reported(168).

138 **ECFCs adhesion to RBCs**

139 The adhesion assay was modified from Gambero *et al.*(160). Briefly, 96-well plates were
 140 coated with 50 µl of ECFCs from MPN patients, from controls and HUVECs (Lonza, Walk-
 141 ersville, MD) at a concentration of 1.5×10^4 until confluence, for 24 hours, at 37°C with 5%
 142 CO₂. Inflammation was induced with the use of TNFα (R&D Systems, Minneapolis, MN,
 143 USA) 10 ng/ml for 3 hours. After removal of the culture media, RBCs from healthy individuals
 144 were added (2×10^8 cells/ml) in 50 µl of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and incubated
 145 for 30 minutes to allow for adhesion. Non-adherent cells were removed and a 100 µl 1:1

solution of HBSS and Drabkin (Sigma, St Louis, USA) was added to each well. Hemolysis was produced by the addition of the Drabkin solution and the % of adhered RBCs was determined through the absorbance of the cyanmethemoglobin derived from the oxidized hemoglobin. A standard curve was built with known concentrations of RBCs added to another 96-well plate. All experiments were conducted in triplicates, with at least two experiments per colony.

Wound healing assay

Endothelial cell migration was assessed through an *in vitro* scratch assay(161). HUVECs and ECFCs from both controls and MPN patients were cultured in 24-well plates until confluence, for 24 hours under 37°C with 5% CO₂. A scratch with a P10 pipette tip was performed, creating an acellular space (Figure 1F). Wound closure was then assessed hourly throughout a 24-hour period, with an inverted microscope (Zeiss LSM780-NLO, Carl-Zeiss, Jena, Germany) at a 10X magnification, with three images per well at each time point. Images were analyzed with the Image J software (National Institutes of Health, NIH Image, Bethesda, MD) and migration assessed as the rate of wound closure. All experiments were conducted in triplicates.

***In vitro* endothelial tube formation**

HUVECs and ECFCs from MPN patients and healthy volunteers were cultured in a 24-well plate (10×10^4 cells/well) with a basement-membrane-like substrate (Matrigel™, BD Biosciences, Carlsbad, CA) for 24 hours. Images were taken after 5, 15, 24 and 40 hours in an inverted microscope (Olympus IX81, Olympus, Miami, FL) coupled with a digital camera (Olympus DP72, Olympus, Miami, FL) at a 4X magnification in phase-contrast mode. After multiple rounds of experiments, hour 15 was selected as the best timepoint for angiogenesis evaluation. Images were assessed by the Image J software, using a plug-in (Angiogenesis Analyzer) that counted network parameters such as meshes, segments, and nodes, which

171 were surrogates for angiogenesis capacity(169). All experiments were conducted in tripli-
172 cates.

173 **ECFCs gene expression**

174 RNA was extracted from control and MPN ECFCs between the 4th and 7th passage after co-
175 culture with RBCs from healthy volunteers using the RNeasy Protect Cell Mini Kit (Qiagen®,
176 Hilden, Germany). Gene expression was evaluated with two real-time PCR-based arrays
177 from Qiagen®: one with 84 genes related to endothelial cell biology (RT2 Profiler® PCR array
178 PAHS-015ZA), from here on designated Array I and another with 84 genes related to signal
179 transduction pathways (RT2 Profiler® PCR array PAHS-014ZA), from here on designated
180 Array II (see Tables S4 and S5 for a list of genes). PCR data was analyzed with the
181 GeneGlobe® Tool from Qiagen®. All data regarding sequencing and gene expression are
182 available upon request

183 **Cytokines, proteins involved in coagulation, proangiogenic factors, and** 184 **adhesion molecules**

185 Plasma levels of ADAM17 and VEGF were determined in both controls and MPN patients
186 in the expansion cohort with the use of ELISA kits (Human TACE Elisa Kit, ThermoScientific,
187 Frederick, MD and Quantikine® ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN) as per the manu-
188 facturer's instructions. We also determined plasma levels of sICAM1, sVCAM1, sP-selectin,
189 IL-8, IL-1Beta, PDGF-AA, PDGF-AB/BB and ADAMTS13 using the Luminex™ technology
190 with Milliplex kits (Human Cardiovascular Disease - CVD Magnetic Bead Panel 2 -
191 HCVD2MAG-67K and Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - HCYTOMAG-
192 60K, EDM Millipore, Billerica, MA) according to the manufacturer's instructions.

193 **Statistical analysis**

194 Statistical analysis was done using GraphPad Prism 8.2 (GraphPad Software Inc., San Di-
195 ego, CA). Normal distribution of continuous variables was tested with the Shapiro-Wilk
196 method. Continuous variables were described as mean $\pm$ standard error of the mean, if they
197 had a normal distribution, or as median $\pm$ interquartile range, if not. Student's T-test was
198 used to compare continuous variables with a normal distribution and Mann-Whitney's U test
199 to compare variables with a skewed distribution. ANOVA was used to compare three or
200 more groups with a normal distribution, with the Bonferroni correction for multiple compari-
201 sons. When samples were skewed, the Kruskal-Wallis test was used. P values of 0.05 or
202 less were considered statistically significant.

203 **Results**

204 **ECFCs isolation**

205 Characteristics of MPN patients and controls from whom ECFC isolation was attempted are
206 described in Table 1. MPN patients and controls shared the same characteristics, except for
207 age, with controls being younger than patients. ECFCs were successfully obtained from 8/14
208 patients (57.1%) and from 9/20 controls (45%) and there was no specific characteristic in
209 either group that predicted a successful ECFC culture.

210 All isolated cells from both patients and controls shared the CD45⁻/CD34⁻/CD133⁻
211 /CD144⁺/CD146⁺/CD31⁺/VEGFR2⁺ phenotype, confirming they are true ECFCs (data not
212 shown). Only one *JAK2V617F*⁺ MPN patient with successful ECFC isolation had a diagnosis
213 of primary myelofibrosis (PMF), with the remaining patients all having polycythemia vera
214 (PV).

215 **ECFCs and *JAK2V617F***

216 Table 2 describes the results of the analysis of the *JAKV617F* mutation expression in ECFCs
217 and granulocytes. One patient was not evaluated with NGS and a VAF was not determined.
218 As for the ECFCs, 8/9, 7/9 and 5/9 were submitted to RFLP-PCR, RQ-PCR and NGS, re-
219 spectively. The main reason for not undergoing any of the techniques for *JAK2V617F*
220 screening was low amplification of the DNA sample. We did not detect *JAK2V617F* in the
221 DNA from any of the tested ECFCs colonies, including those with a history of venous throm-
222 bosis.

223 **Functional characterization of ECFCs**

224 Given that 8/9 patients with successful ECFC isolation had a diagnosis of PV, we chose to
225 report the results of the PV ECFCs only. An analysis including ECFCs from the PMF patient
226 produced the same results (data not shown).

227 PV patients had a higher mean count of ECFC colonies/ 10^7 MNC than controls (0.620 vs.
228 0.275, $P=0.0095$) (Figure 1A). There was no difference in the mean count of ECFC colonies
229 between patients with and without thrombosis.

230 PV ECFCs had a higher adhesion to RBCs from healthy individuals than controls (mean %
231 of adherent RBCs: 20.290 vs. 9.103%, $P=0.0237$) (Figure 1B). History of thrombosis and
232 the addition of TNF α were not related to an increased adhesiveness of PV ECFCs.

233 Angiogenesis, as evaluated through the mean number of network parameters after 15 hours
234 of culture in MatrigelTM was lower in PV ECFCs in comparison with controls, for all the pa-
235 rameters analyzed (mean of 99.65 vs. 52.83, $P=0.002$ for junctions; mean of 130.6 vs. 55.48
236 for segments and median of 34.2 vs. 10.53 for meshes – Figure 1C and D). Conversely,
237 migration, as assessed by the wound-healing assay, was lower in PV ECFCs: median time

238 in hours for a reduction of 50% in the wound area was 8.021 for PV ECFCs vs. 6.871 for
239 controls, $P=0.0048$ (Figure 1E to G).

240 **ECFCs gene expression**

241 To explore the differences in the *in vitro* behavior of the MPN ECFCs we compared the gene
242 expression between ECFCs from patients and controls. For this analysis, we included
243 ECFCs from the patient with PMF. Table 3 summarizes their characteristics.

244 We identified 6 differentially expressed genes in ECFCs from MPN patients: *ADAM17* (Fold
245 change: 5.77, $P=0.003$), *B2M* (Fold change: 3.46, $P=0.004$), *CASP3* (Fold change: 3.81,
246 $P=0.02$) and *KDR* (Fold change: 3.55, $P=0.02$) had a higher expression and *IFNG* (Fold
247 change: 0.43, $P=0.03$) and *WNT5A* (Fold change: 0.45; $P=0.04$) had a lower expression in
248 comparison to ECFCs from controls (Figure 2A)

249 We did not find any difference in gene expression between ECFCs from patients with and
250 without a history of thrombosis (Figure S1).

251 **Plasma levels of cytokines, proteins involved in coagulation, proangio- 252 genic factors, and adhesion molecules**

253 To validate the finding of higher endothelial expression of *ADAM17*, we measured plasma
254 levels of ADAM17, as well as other molecules involved in adhesion (sVCAM, sICAM1, and
255 sP-selectin), inflammation (IL-1 β , and IL-8) and coagulation (sCD40L and ADAMTS13)—
256 some of them (sVCAM and sICAM1) targets of ADAM17—in an expansion cohort (described
257 above). Also, given the opposite findings of a lower angiogenic capacity with a higher ex-
258 pression of the *VEGFR2* in MPN ECFCs, we measured the levels of proangiogenic factors,
259 such as VEGF, PDGF-AA and PDGF-AB/BB in the same cohort. Table 4 summarizes the
260 characteristics of this expansion cohort.

MPN patients had a higher plasma level of ADAM17 than controls (median 173.90 pg/ml vs. 71.44 pg/ml, $P=0.0116$) which seems to be related to the *JAK2V617F*. *JAK2V617F*⁺ patients had higher levels of ADAM17 than *JAK2V617F*⁻ (median 294.7 pg/ml vs. 79.99 pg/ml, $P=0.0342$). Plasma levels of ADAM17 did not differ between *JAK2V617F*⁻ MPN patients and controls, between patients with and without a previous venous thrombosis (Figure 2B) and between with and without a previous cardiovascular event (median 146.8 vs. 142.6 pg/ml, $P=0.92$).

Contrary to the finding of reduced angiogenesis in MPN ECFCs, VEGF was increased in MPN patients in comparison with controls (median 35 vs. 15.4 pg/ml, $P<0.0001$). This difference was not observed when MPN patients were compared regarding their *JAK2V617F* status or their history of venous or arterial thrombosis (Figure 2C)

The data on the remaining analytes measured in the plasma of the expansion cohort is depicted in Figure 3. Briefly, of the measured analytes, only IL-1 β was not increased in MPN patients compared with controls, suggesting that the increase in sICAM1 and sVCAM is not dependent on stimulation by this cytokine (Figure 3A). ADAMTS13 was the only protein with plasma levels showing variation according to the *JAK2V617F* status: MPN patients harboring this mutation had lower levels of ADAMTS13 than *JAK2V617F*⁻ patients (median 907.63 vs. 995.65 pg/ml, $P=0.044$), which is consistent with the association between low ADAMTS13 levels and cardiovascular events, such as myocardial infarction(170, 171). Regarding the history of thrombosis, MPN patients with a previous episode showed higher levels of sP-selectin (103.9 pg/ml vs. 51.38 pg/ml, $P<0.0001$), PDGF-AA (242.1 vs. 111.3 pg/ml, $P=0.0005$) and sCD40L (316.4 vs. 128.7 pg/ml, $P=0.0031$) (Figure 3B)

Discussion

Here, we have shown, that ECFCs from *JAK2V617F*⁺ MPN patients have a distinct phenotype, characterized by an increased adhesiveness to RBCs *in vitro* and a lower angiogenesis

286 and migration capacity. This phenotype is not related to the expression of *JAK2V617F* in
287 these ECFCs, which we did not detect, using targeted NGS, even in patients with previous
288 thrombosis, but appears to be related to a reduced expression of *WNT5A* and an increased
289 expression of *ADAM17*, which was increased in plasma of MPN patients, particularly those
290 *JAK2V617F*⁺.

291 Although the expression of *JAK2V617F* in ECs has been well documented^(137, 138), its ex-
292 pression on ECFCs has produced contradictory results. Yoder *et al.* found *JAK2V617F* mu-
293 tations in ECFCs from a single patient (1/11) who had a history of thrombosis, raising the
294 possibility of contamination by hematopoietic cells, a germline mutation or a somatic vascu-
295 lar mutation⁽¹⁶⁵⁾. Piaggio *et al.* were not able to detect *JAK2V617F* in the ECFCs from any
296 of 30 patients with *JAK2V617F*⁺ MPN, with no information on their history of thrombosis⁽¹³²⁾.
297 The work by Teofilli *et al.* was the only one to report the presence of *JAK2V617F* mutation
298 in ECFCs from 4/17 patients with MPN, all of whom had a history of venous thrombosis⁽¹³⁵⁾.
299 Finally, Rosti *et al.* identified *JAK2V617F* ECs in the spleen vasculature from MPN patients
300 but not on splenic ECFCs. In their work, nonetheless, none of the patients had a history of
301 thrombosis⁽¹³⁷⁾.

302 A more recent report has described the presence of *JAK2V617F* in bone marrow-derived
303 ECFCs from 4/5 patients, using whole-exome sequencing⁽¹⁷²⁾. However, the technique
304 described for ECFC isolation is traditionally used for isolation of CFU-ECs and the pheno-
305 typic characterization of the isolated cells did not include CD45 or CD14, which are manda-
306 tory for excluding myeloid derivation⁽¹³⁶⁾. Altogether, it is likely that their results are biased
307 by at least some degree of contamination with endothelial cells from myeloid origin (such as
308 CFU-EC).

309 The question of whether ECFCs express *JAK2V617F* goes beyond their role in the patho-
310 physiology of thrombosis. Hematopoietic and endothelial cells are thought to share a

311 common precursor, the hemangioblast(127), and if a putative endothelial precursor, such
312 as ECFCs, is found to harbor this mutation, it prompts the conclusion that the true MPN
313 stem cell is the hemangioblast. This could explain the identification of *JAK2V617F* in mature
314 ECs, as has been reported. Nonetheless, Rosti *et al.* argued, in their paper, that the finding
315 of *JAK2V617F* in ECs from the splenic vasculature in parallel with the lack of this mutation
316 in ECFCs from the same microenvironment (spleen) does not support the hypothesis that
317 the latter originated the former⁽¹³⁷⁾. Our results, the first report of MPN ECFCs from
318 *JAK2V617F*⁺ patients with a history of thrombosis, lacking the disease-specific mutation as
319 assessed by different sequencing techniques, including NGS, with both functional and phe-
320 notypic characterization of ECFCs to ascertain their endothelial nature, confirm these find-
321 ings.

322 Despite the lack of this mutation, *JAK2V617F*⁻ ECFCs from *JAK2V617F*⁺ MPN patients had
323 distinct functional properties *in vitro*, when compared to ECFCs from controls. ECFCs are a
324 putative EPC that give rise to a well-differentiated endothelial progeny that is suitable for ex-
325 vivo assessments of the endothelial function in several diseases(173). Other studies have
326 already described an increased adhesiveness to leukocytes, from *JAK2V617F*⁺ ECs using
327 different experimental models(123, 125). These studies, though, used cell-lines (HUVECs,
328 iPS) or animal EC models with *JAK2V617F* expression, which, as opposed to ECFCs, as-
329 sume a homogenous and universal expression of this mutation throughout the endothelium
330 and among different patients, not reproducing the *in vivo* pathophysiology of the disease.

331 Among the distinct functional properties of *JAK2V617F*⁻ ECFCs is an increased adhesive-
332 ness of ECFCs to RBCs, an important player in the pathophysiology of thrombosis(174),
333 which we show here for the first time. The fact that these RBCs were isolated from healthy
334 individuals underscores the role of ECFCs in this process, as increased adhesion of RBCs
335 from PV patients to HUVECs has already been reported⁽¹¹⁸⁾. These distinct functional prop-
336 erties were further represented by a decreased angiogenesis and migration capacity and,

337 once again, were unrelated to the *JAK2V617F*. This confirms previous findings on the re-
338 duced angiogenesis capacity of ECFCs from PMF patients(175) and could be representative
339 of an endothelial dysfunction that contributes to the higher incidence of cardiovascular dis-
340 ease in patients with MPN.

341 The analysis of gene expression from MPN ECFCs gave us an insight into the possible
342 *JAK2*-independent mechanisms of this phenotype. ADAM17 is a metalloprotease that com-
343 bines functions of cell surface adhesion molecule and protease, being involved in the shed-
344 ding of several membrane-bound proteins, such as TNF α , VEGFR2, sVCAM and
345 sICAM1(176-178). Its role in tumor angiogenesis and cancer progression⁽¹⁷⁹⁾, cardiovascu-
346 lar⁽¹⁸⁰⁾ and inflammatory diseases⁽¹⁸¹⁾ has been extensively studied. To the best of our
347 knowledge, this is the first report of a higher expression of *ADAM17* in *JAK2V617F*⁻ ECFCs
348 from *JAK2V617F*⁺ MPN patients. Elevated levels of ADAM17 were also found in the plasma
349 of MPN patients and seemed to be higher in those with the *JAK2V617F* mutation. Given the
350 several targets of this protein, it could be involved in the shedding of adhesion molecules
351 such as sVCAM and sICAM1, and inflammatory cytokines, such as TNF α , promoting the
352 inflammatory and pro-adhesive milieu characteristic of MPNs. Also, by promoting the shed-
353 ding of VEGFR2, ADAM17 hyperexpression could explain the lower angiogenesis capacity
354 observed in the MPN ECFCs. Accordingly, a lower expression of *WNT5A* has been shown
355 to promote an ADAM17-mediated impairment in angiogenesis through a lower expression
356 of *CDC42*(182). Another possible mechanism for a *WNT5A*-mediated reduction in angio-
357 genesis could be a reduction in the inositol 1,4,5-triphosphate-dependent Ca²⁺ release from
358 the endoplasmic reticulum, a process already known to be involved in the reduced angio-
359 genesis of ECFCs from patients with PMF(175, 183). Further studies are warranted to de-
360 fine the exact role of ADAM17 in MPNs.

361 Nevertheless, we were not able to answer the question of how ECFCs that do not harbor
362 the disease driver mutation can share a disease-specific phenotype. Campanelli *et al.* have

recently described the expression of *RUNX1*, a hematopoietic transcription factor, in splenic ECFCs, but not in circulating ECFCs(184). This supports a role of the microenvironment in the gene expression of ECFCs. Extracellular vesicles have been shown to be able to transmit *BCR-ABL1* from K562 cells into HUVECs in coculture(185). This could represent a possible mechanism by which disease and microenvironment-specific characteristics can be transferred to and influence the phenotype of ECFCs that do not harbor the *JAK2V617F* mutation, including the *JAK2V617F* mutation itself, being one possible explanation of the identification of *JAK2V617F*⁺ ECFCs. Other limitations of our work include the low number of patients, the bias toward polycythemia vera and the lack of NGS data on ECFCs from all patients.

In conclusion, we showed that the increased adhesion of ECFCs from MPN patients is not dependent on the expression of this mutation and is probably related to an increased expression of *ADAM17*, observed in both the ECFCs and plasma of MPN patients. Our findings highlight the need of looking into alternative, non-*JAK2*-dependent prothrombotic mechanisms in MPN patients, which could lead to the development of new therapeutic approaches in the prevention of thrombosis in this patient population.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant Number 2014/00984-3 and from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Nível superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001 to M. C. O., and from the Ontario Institute for Cancer Research and Southeastern Ontario Academic Medical Organization to M. J. R.

385 **Authorship Contributions**

386 Contribution: B. K. L. D., S.O.P., L.H.S., J.O.F., P.E.S. and G.G.Y.H. collected samples and
 387 performed experiments; B. K. L. D., S.O.P., L.H.S. and J.O.F. analyzed the results. B. K. L.
 388 D. made the figures; B. K. L. D., S.O.P., F.F.C and M. C. O. designed the research. B. K. L.
 389 D. wrote the manuscript. G. G. Y. H., M. C. O., M. J. R. and F. F. C. reviewed the manuscript.

390 **Conflict of Interest Disclosures**

391 The authors have no conflict of interest to disclose.

392 **References**

- 393 1. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with
 394 contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*. 2013;27(9):1874-1881.
- 395 2. Falchi L, Kantarjian HM, Verstovsek S. Assessing the thrombotic risk of patients with
 396 essential thrombocythemia in the genomic era. *Leukemia*. 2017;31(9):1845-1854.
- 397 3. Zhan H, Lin CHS, Segal Y, Kaushansky K. The JAK2V617F-bearing vascular niche
 398 promotes clonal expansion in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2017;32(2):462-
 399 469.
- 400 4. Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le Lay N, et al. Vascular endothelial cell expression
 401 of JAK2(V617F) is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin
 402 expression. *Haematologica*. 2019;104(1):70-81.
- 403 5. Guadall A, Lesteven E, Letort G, et al. Endothelial Cells Harboring the JAK2V617F
 404 Mutation Display Pro-Adherent and Pro-Thrombotic Features. *Thrombosis and haemosta-*
 405 *sis*. 2018;118(9):1586-1599.
- 406 6. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus State-
 407 ment on Nomenclature. *Stem cells translational medicine*. 2017;6(5):1316-1320.
- 408 7. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal
 409 analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109(5):1801-1809.
- 410 8. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial
 411 progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9):2752-
 412 2760.

- 413 9. Teofili L, Martini M, Iachininoto MG, et al. Endothelial progenitor cells are clonal and
414 exhibit the JAK2(V617F) mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative
415 myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;117(9):2700-2707.
- 416 10. Piaggio G, Rosti V, Corselli M, et al. Endothelial colony-forming cells from patients
417 with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality
418 marker. *Blood*. 2009;114(14):3127-3130.
- 419 11. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of
420 JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome.
421 *Blood*. 2009;113(21):5246-5249.
- 422 12. Rosti V, Villani L, Riboni R, et al. Spleen endothelial cells from patients with myelofi-
423 brosis harbor the JAK2V617F mutation. *Blood*. 2013;121(2):360-368.
- 424 13. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, et al. Cardiovascular events and intensity of treat-
425 ment in polycythemia vera. *The New England journal of medicine*. 2013;368(1):22-33.
- 426 14. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haemato-
427 crit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet (London, England)*. 1978;2(8102):1219-
428 1222.
- 429 15. De Grandis M, Cambot M, Wautier M-P, et al. JAK2V617F activates Lu/BCAM-medi-
430 ated red cell adhesion in polycythemia vera through an EpoR-independent Rap1/Akt path-
431 way. *Blood*. 2013;121(4):658-665.
- 432 16. Wautier M-P, El Nemer W, Gane P, et al. Increased adhesion to endothelial cells of
433 erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin alpha5 chain and
434 Lu/BCAM. *Blood*. 2007;110(3):894-901.
- 435 17. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organ-
436 ization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-
437 2405.
- 438 18. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and
439 endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(1):71-77.
- 440 19. Sakamoto TM, Lanaro C, Ozelo MC, et al. Increased adhesive and inflammatory
441 properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. *Microvascu-*
442 *lar research*. 2013;90:173-179.
- 443 20. Didone A, Nardinelli L, Marchiani M, et al. Comparative study of different methodolo-
444 gies to detect the JAK2 V617F mutation in chronic BCR-ABL1 negative myeloproliferative
445 neoplasms. *Practical laboratory medicine*. 2015;4:30-37.
- 446 21. Sekeres MA, Othus M, List AF, et al. Randomized Phase II Study of Azacitidine Alone
447 or in Combination With Lenalidomide or With Vorinostat in Higher-Risk Myelodysplastic

- 448 Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia: North American Intergroup Study
449 SWOG S1117. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clin-*
450 *ical Oncology*. 2017;35(24):2745-2753.
- 451 22. Gambero S, Canalli AA, Traina F, et al. Therapy with hydroxyurea is associated with
452 reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomi-
453 tant reduction in adhesive properties. *European journal of haematology*. 2007;78(2):144-
454 151.
- 455 23. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive
456 method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007;2(2):329-333.
- 457 24. Ferratge S, Ha G, Carpentier G, et al. Initial clonogenic potential of human endothelial
458 progenitor cells is predictive of their further properties and establishes a functional hierarchy
459 related to immaturity. *Stem cell research*. 2017;21:148-159.
- 460 25. Maino A, Siegerink B, Lotta LA, et al. Plasma ADAMTS-13 levels and the risk of my-
461 ocardial infarction: an individual patient data meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Hae-*
462 *mostasis*. 2015;13(8):1396-1404.
- 463 26. Andersson HM, Siegerink B, Luken BM, et al. High VWF, low ADAMTS13, and oral
464 contraceptives increase the risk of ischemic stroke and myocardial infarction in young
465 women. *Blood*. 2012;119(6):1555-1560.
- 466 27. Helman R, Pereira WdO, Marti LC, et al. Granulocyte whole exome sequencing and
467 endothelial JAK2V617F in patients with JAK2V617F positive Budd-Chiari Syndrome without
468 myeloproliferative neoplasm. *British journal of haematology*. 2018;180(3):443-445.
- 469 28. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial
470 progenitor cells. *Leukemia*. 2007;21(6):1141-1149.
- 471 29. Bautch VL. Stem cells and the vasculature. *Nature medicine*. 2011;17(11):1437-
472 1443.
- 473 30. Hebbel RP. Blood endothelial cells: utility from ambiguity. *The Journal of clinical in-*
474 *vestigation*. 2017;127(5):1613-1615.
- 475 31. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood*. 2017;130(16):1795-
476 1799.
- 477 32. Dragoni S, Reforgiato M, Zuccolo E, et al. Dysregulation of VEGF-induced proangio-
478 genic Ca²⁺ oscillations in primary myelofibrosis-derived endothelial colony-forming cells.
479 *Experimental hematology*. 2015;43(12):1019-1030.e1013.
- 480 33. Grötzinger J, Lorenzen I, Düsterhöft S. Molecular insights into the multilayered regu-
481 lation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochimica et biophysica acta Molec-*
482 *ular cell research*. 2017;1864(11 Pt B):2088-2095.

- 483 34. Tsakadze NL, Sithu SD, Sen U, English WR, Murphy G, D'Souza SE. Tumor necrosis
484 factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of in-
485 tercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *The Journal of biological chemistry*.
486 2006;281(6):3157-3164.
- 487 35. Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, et al. Stimulated shedding of vascular cell adhesion
488 molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme
489 (ADAM 17). *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(39):37459-37464.
- 490 36. Moss ML, Minond D. Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target
491 for Cancer and Inflammation. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:9673537-9673537.
- 492 37. Chemaly M, McGilligan V, Gibson M, et al. Role of tumour necrosis factor alpha con-
493 verting enzyme (TACE/ADAM17) and associated proteins in coronary artery disease and
494 cardiac events. *Archives of cardiovascular diseases*. 2017;110(12):700-711.
- 495 38. Lambrecht BN, Vanderkerken M, Hammad H. The emerging role of ADAM metallo-
496 proteinases in immunity. *Nature reviews Immunology*. 2018;18(12):745-758.
- 497 39. Jin Y, Liu Y, Lin Q, et al. Deletion of Cdc42 enhances ADAM17-mediated vascular
498 endothelial growth factor receptor 2 shedding and impairs vascular endothelial cell survival
499 and vasculogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(21):4181-4197.
- 500 40. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta biochimica et biophysica*
501 *Sinica*. 2011;43(10):745-756.
- 502 41. Campanelli R, Massa M, Villani L, et al. RUNX1 Expression Characterizes the Endo-
503 thelial Cells from the Spleen and Bone Marrow of Patients with Primary Myelofibrosis. *Blood*.
504 2018;132(Supplement 1):5486-5486.
- 505 42. Ramos TL, Sánchez-Abarca LI, López-Ruano G, et al. Do endothelial cells belong to
506 the primitive stem leukemic clone in CML? Role of extracellular vesicles. *Leukemia rese-*
507 *arch*. 2015;39(8):921-924.

508

509

510 **Tables****TABLE 1** – Characteristics of individuals in the ECFC cohort

Characteristics	Controls		MPN	
	All (n=14)	ECFC isolation (n=8)	All (n=20)	ECFC isolation (n=9)
Successful ECFCs isolation	8 (57.1)	NA	9 (45)	NA
Median time to the appearance of the first colony in days (range)	NA	15 (11-22)	NA	16 (12-19)
Age, median (range)	30 (22-53)	29 (22-53)	49 (29-79)	48 (9-79)
Gender				
Male, n (%)	6 (43)	4 (50)	8 (66.7)	2 (22.2)
Female, n (%)	8 (57)	4 (50)	12 (33.3)	7 (77.8)
Diagnosis				
Polycythemia vera, n (%)	—	—	15 (75)	8 (88.9)
Essential thrombocythemia, n (%)	—	—	3 (15)	0 (0)
Primary myelofibrosis, n (%)	—	—	2 (10)	1 (11.1)
Median time from diagnosis in months (range)	—	—	1 (0-203)	0 (0-105)
Previous venous thrombosis, n (%)	0 (0)	(0)	9 (45)	5 (55.6)
Portal vein, n (% of thrombosis)	—	—	6 (66.7)	2 (40)
Budd-Chiari, n (% of thrombosis)	—	—	1 (11.1)	1 (20)
Lower extremities, n (% of thrombosis)	—	—	1 (11.1)	1 (20)
Mesenteric, n (% of thrombosis)	—	—	1 (11.1)	1 (20)
Previous cardiovascular event, n (%)	0(0)	(0)	2 (10.5)	1 (11.1)
AMI, n (% of cardiovascular events)	—	—	2 (100)	1 (100)
History of hypertension, n (%)	2 (14.3)	1 (12.5)	11 (55)	4 (44.4)
History of dyslipidemia, n (%)	6 (42.9)	6 (75)	3 (15)	1 (11.1)
History of diabetes, n (%)	2 (14.3)	1 (12.5)	3 (15)	2 (22.2)
Previous or current smoking, n (%)	5 (35.7)	3 (37.5)	5 (25)	1 (11.1)
Current use of aspirin, n (%)	2 (14.3)	0 (0)	10 (50)	3 (33.3)
Current use of oral anticoagulants, n (%)	0 (0)	0 (0)	3 (15)	2 (22.2)
Current use of hydroxyurea, n (%)	0 (0)	0 (0)	8 (40)	2 (22.2)

Abbreviations: **AMI:** acute myocardial infarction; **ECFCs:** endothelial colony-forming cells; **MPN:** myeloproliferative neoplasms; **NA:** not applicable

TABLE 2 – JAK2V617F determination in ECFCs and granulocytes from MPN patients

Patient	Diagnosis	Previous thrombosis	Months from diagnosis	Use of HU at ECFC isolation	JAK2 status						
					Granulocytes			N of colonies	ECFCs		
					RFLP-PCR	RQ-PCR	NGS (VAF)		RFLP-PCR	RQ-PCR	NGS (VAF)
1	PV	No	3	No	V617F	V617F	V617F (5.5)	7	WT	WT	WT
2	PV	No	0	No	V617F	V617F	V617F (4.1)	2	WT	WT	WT
4	PV	PVT	0	No	V617F	V617F	V617F (6.2)	3	WT	WT	NA
5	PV	No	0	No	V617F	V617F	V617F (16.7)	3	WT	WT	WT
6	PV	DVT	0	No	V617F	V617F	V617F (16.4)	1	WT	WT	NA
8	PV	BCS	0	No	V617F	V617F	NA	4	WT	NA	WT
14	PV	No	105	8500 mg/week	V617F	V617F	V617F (10.3)	1	WT	WT	NA
19	PMF	Mesenteric	0	No	V617F	V617F	V617F (64.3)	3	WT	WT	WT
20	PV	PVT	0	3500 mg/week	V617F	ND	ND	1	ND	ND	ND

Abbreviations: **BCS:** Budd-Chiari Syndrome; **DVT:** deep vein thrombosis of lower extremities; **ECFCs:** endothelial colony-forming cells; **HU:** hydroxyurea; **MPN:** myeloproliferative neoplasms; **N:** number; **NA:** not available due to insufficient/inadequate DNA; **NGS:** next-generation sequencing; **PMF:** primary myelofibrosis; **PV:** polycythemia vera; **PVT:** portal vein thrombosis; **RFLP:** restriction fragment length polymorphism; **RQ:** real-time quantitative; **VAF:** variant allele frequency; **WT:** wildtype.

TABLE 3 – Characteristics of patients and controls with ECFCs for gene expression analysis

Characteristics	ECFCs MPN		ECFCs CTRL (n=3)
	Array I (n=6)	Array II (n=3)	
Age, median (range)	48 (29-49)	48.5 (29-51)	35 (31-59)
Gender			
Male, n (%)	12 (27.9)	1 (33)	1 (33)
Female, n (%)	31 (72.1)	2 (67)	2 (67)
Diagnosis			
Polycythemia vera, n (%)	5 (83.3)	3 (100)	—
Essential thrombocythemia, n (%)	0 (0)	0 (0)	—
Primary myelofibrosis, n (%)	1 (16.7)	0 (0)	—
JAK2 V617F mutation (granulocytes), n (%)	6 (100)	3 (100)	—
Previous episode of DVT, n (%)	3 (50)	1 (33)	0 (0)
Previous cardiovascular disease, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Current use of hydroxyurea, n (%)	2 (33)	0 (0)	—

Abbreviations: CTRL: healthy individuals; DVT: deep venous thrombosis; ECFCs: endothelial colony-forming cells; MPN: myeloproliferative neoplasms;

TABLE 4 – Characteristics of patients and controls included in the expansion cohort

Characteristics	Expansion cohort (n=128)		ADAM17 cohort (n=71)	
	MPN (n=91)	CTRL (n=37)	MPN (n=44)	CTRL (n=27)
Age, median (range)	61 (26-90)	35 (18-67)	61 (26-88)	40 (30-58)
Gender				
Male, n (%)	30 (33)	19 (51.4)	12 (27.3)	14 (51.9)
Female, n (%)	61 (67)	18 (48.6)	32 (72.7)	13 (48.1)
Diagnosis				
Polycythemia vera, n (%)	42 (46.2)	—	23 (52.3)	—
Essential thrombocythemia, n (%)	35 (38.5)	—	16 (36.4)	—
Primary myelofibrosis, n (%)	14 (15.4)	—	5 (11.4)	—
JAK2 V617 mutation, n (%)	61 (67)	—	32 (72.7)	—
Polycythemia vera, n (% of PV)	42 (100)	—	23 (100)	—
Essential thrombocythemia, n (% of ET)	13 (37.1)	—	7 (43.8)	—
Primary myelofibrosis, n (% of PMF)	6 (42.9)	—	2 (40)	—
Median time from diagnosis, in months (range)	40 (0-225)	—	46 (0-225)	—
Previous episode of DVT, n (%)	21 (23.1)	0 (0)	15 (34.9)	0 (0)
Portal vein thrombosis, n (%)	9 (42.9)	—	7 (46.7)	—
Budd-Chiari syndrome, n (%)	2 (9.4)	—	2 (13.3)	—
Cerebral veins, n (%)	3 (14.3)	—	1 (6.7)	—
Lower extremities, n (%)	5 (23.8)	—	3 (20)	—
Pulmonary embolism, n (%)	1 (4.8)	—	1 (6.7)	—
Mesenteric vein, n (%)	1 (4.8)	—	1 (6.7)	—
Previous cardiovascular event, n (%)	14 (15.4)	0 (0)	8 (18.2)	0 (0)
Acute myocardial infarction, n (%)	5 (35.7)	—	2 (25)	—
Peripheral artery disease, n (%)	3 (21.4)	—	1 (12.5)	—
Stroke, n (%)	2 (14.3)	—	2 (25)	—
Others, n (%)	4 (28.6)	—	3 (37.5)	—
Previous or current smoking, n (%)	24 (28.4)	8 (21.6)	10 (22.7)	7 (25.9)
History of hypertension, n (%)	56 (61.5)	5 (13.5)	26 (59.1)	5 (18.5)
History of dyslipidemia, n (%)	31 (34.1)	7 (18.9)	15 (34.1)	6 (22.2)
History of diabetes, n (%)	14 (15.4)	3 (8.1)	5 (11.4)	3 (11.1)
Current use of aspirin, n (%)	67 (73.6)	7 (18.9)	31 (70.5)	5 (18.5)
Current use of oral anticoagulants, n (%)	11 (12.1)	0 (0)	5 (11.4)	0 (0)
Current use of hydroxyurea, n (%)	59 (64.8)	0 (0)	31 (72.1)	0 (0)

Abbreviations: CTRL: healthy individuals; DVT: deep venous thrombosis; ET: essential thrombocythemia; MPN: myeloproliferative neoplasms PMF: primary myelofibrosis; PV: polycythemia vera

Figure Legends

Figure 1 - Functional characterization of endothelial colony-forming cells (ECFCs). **A)** number of isolated ECFCs colonies/ 10^7 mononuclear cells (MNC) derived from healthy individuals (CTRL) and polycythemia vera (PV) patients. **B)** Red blood cells (RBCs) adhesion (as % of cells adhered) to ECFCs from CTRL, PV patients and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) before (basal) and after (TNF α) stimulus. **C)** Analysis of angiogenesis capacity through the number of structures for each network parameter (junctions, segments and meshes) in a culture with MatrigelTM for CTRL, PV and HUVECs. **D)** Photomicrographs taken at 4X used for angiogenesis analysis showing network parameters formation of ECFCs after 15 hours of culture with MatrigelTM. Each photo is representative of each group: CTRL, PV and HUVEC. The black scale bar indicates 200 μ m. **E)** % original wounded area closed for each time point after the initial wound was made (Hour 0) for CTRL (black), PV (red) and HUVEC (blue). Individual points represent means and whiskers, the standard error of mean. **F)** Mean time, in hours, for the closure of 50% of the original wounded area for each group. **G)** Photomicrographs taken at 10X used for the analysis of wound healing assays. On the left column, photomicrographs taken at Hour 0, representative of the initial wounded area for each group. On the right column, photomicrographs taken at Hour 24, showing the disappearance of the wounded area for each group. The black scale bar indicates 100 μ m. In all panels, except otherwise notated, bars represent means and whiskers, the standard error of the mean. Black diamonds, red circles, and blue inverted triangles indicate individual data points for controls, PV patients and HUVECs, respectively. n indicates the number of experiments, i indicates the number of individuals and p indicates the number of patients. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001.

Figure 2 - Gene expression of endothelial colony-forming cells (ECFCs) and plasma concentrations of ADAM17 and VEGF. A) Volcano plot depicting the fold change on the expression of 168 genes (Tables S4 and S5) between ECFCs from myeloproliferative neoplasms patients (MPN) and healthy individuals (CTRL). Red circles indicate overexpressed genes and blue circles indicate underexpressed genes. Light blue shaded areas correspond to genes with a significant fold change (< 0.5 or > 2) with a $P < 0.05$. **B) and C)** Box plots with the concentration of ADAM17 **(A)** and VEGF **(B)** in 91 patients and 37 controls of the expansion cohort (44 and 27, respectively, for ADAM17). In the left, the comparison between MPN patients and CTRL, in the middle the comparison between *JAK2* wild-type and *JAK2V617F* MPN patients and in the right the comparison of MPN patients with and without a history of deep venous thrombosis (DVT). Boxes represent the interquartile range, the bold line the median, and the whiskers the 2.5-97.5 percentile. Black diamonds, red circles, green triangles and yellow squares indicate individual data points for CTRL, polycythemia vera patients (PV), essential thrombocythemia patients (ET) and primary myelofibrosis patients (PMF). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Figure 3 - Plasma levels of cytokines, proteins involved in coagulation, proangiogenic factors, and adhesion molecules. A) Plasma levels in healthy individuals (CTRL) and patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) of ADAMTS13, sP-selectin, sICAM1, sVCAM, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, IL-8, IL-1 β and sCD40L. **B)** Plasma levels in MPN patients with and without a history of deep venous thrombosis (DVT) of sP-selectin, PDGF-AA and sCD40L. Boxes represent the interquartile range, the bold line the median, and the whiskers the 2.5-97.5 percentile. Black diamonds, red circles, green triangles and yellow squares indicate individual data points for CTRL, polycythemia vera patients (PV), essential thrombocythemia patients (ET) and primary myelofibrosis patients (PMF). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Figures

Figure 1

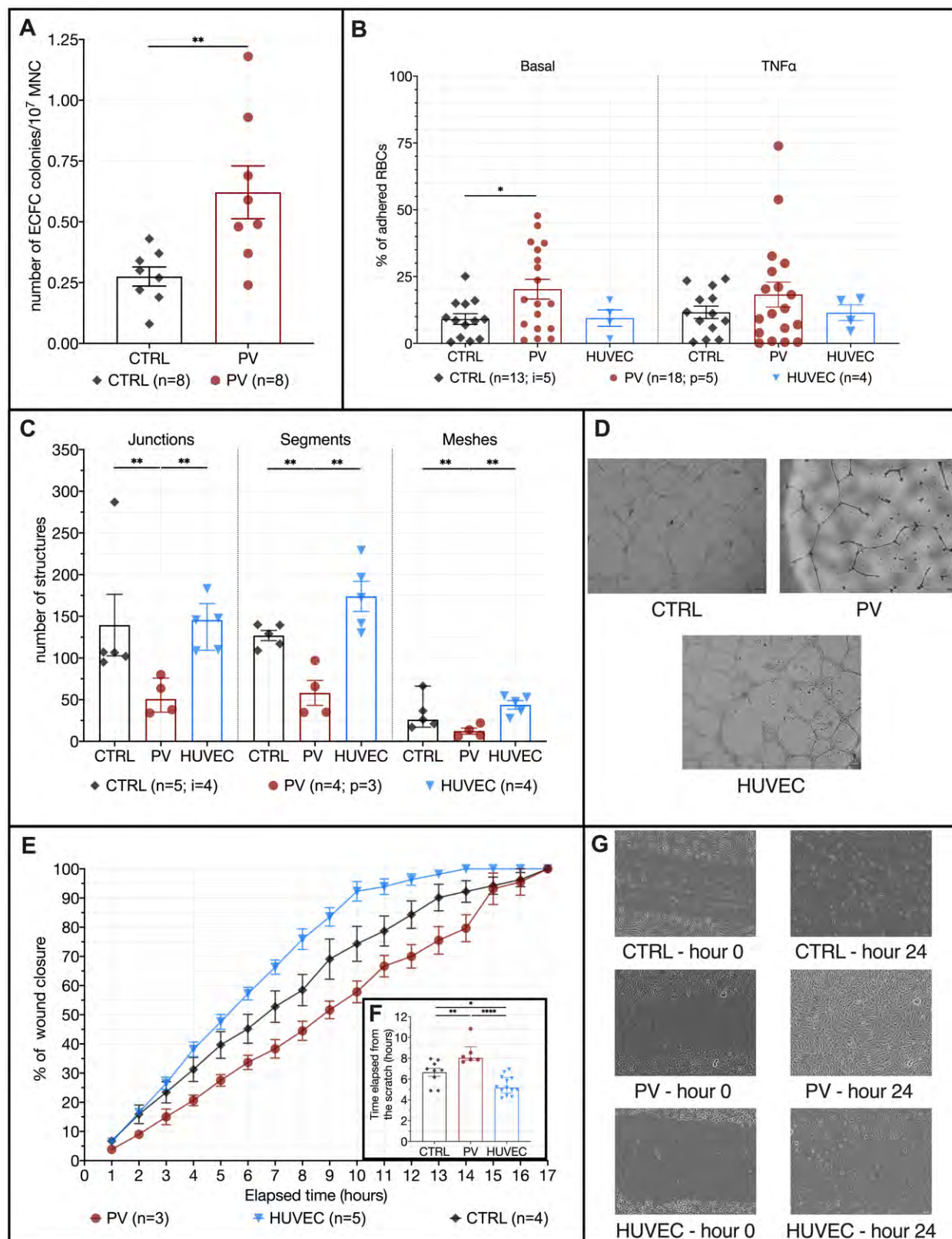


Figure 2

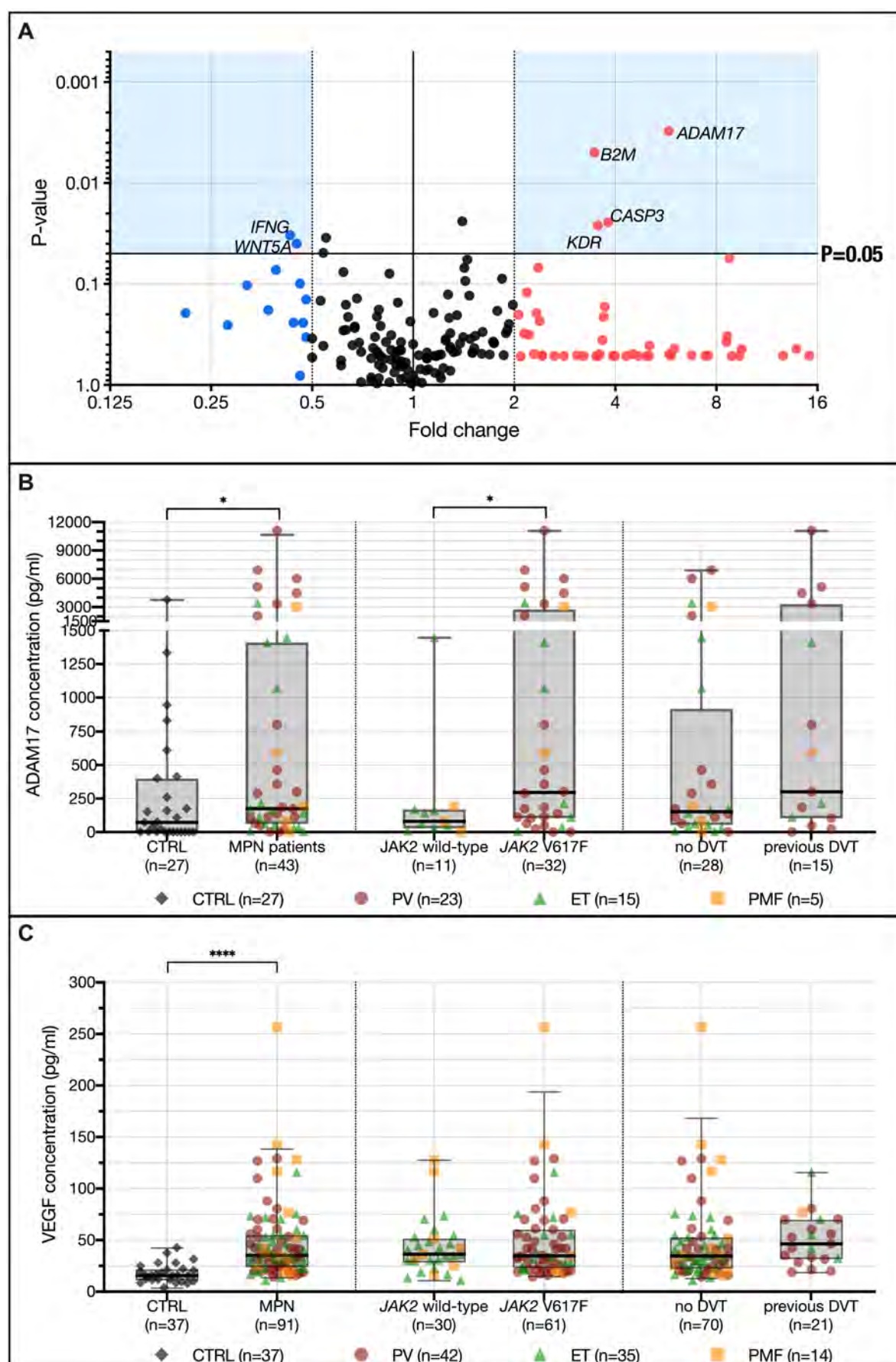
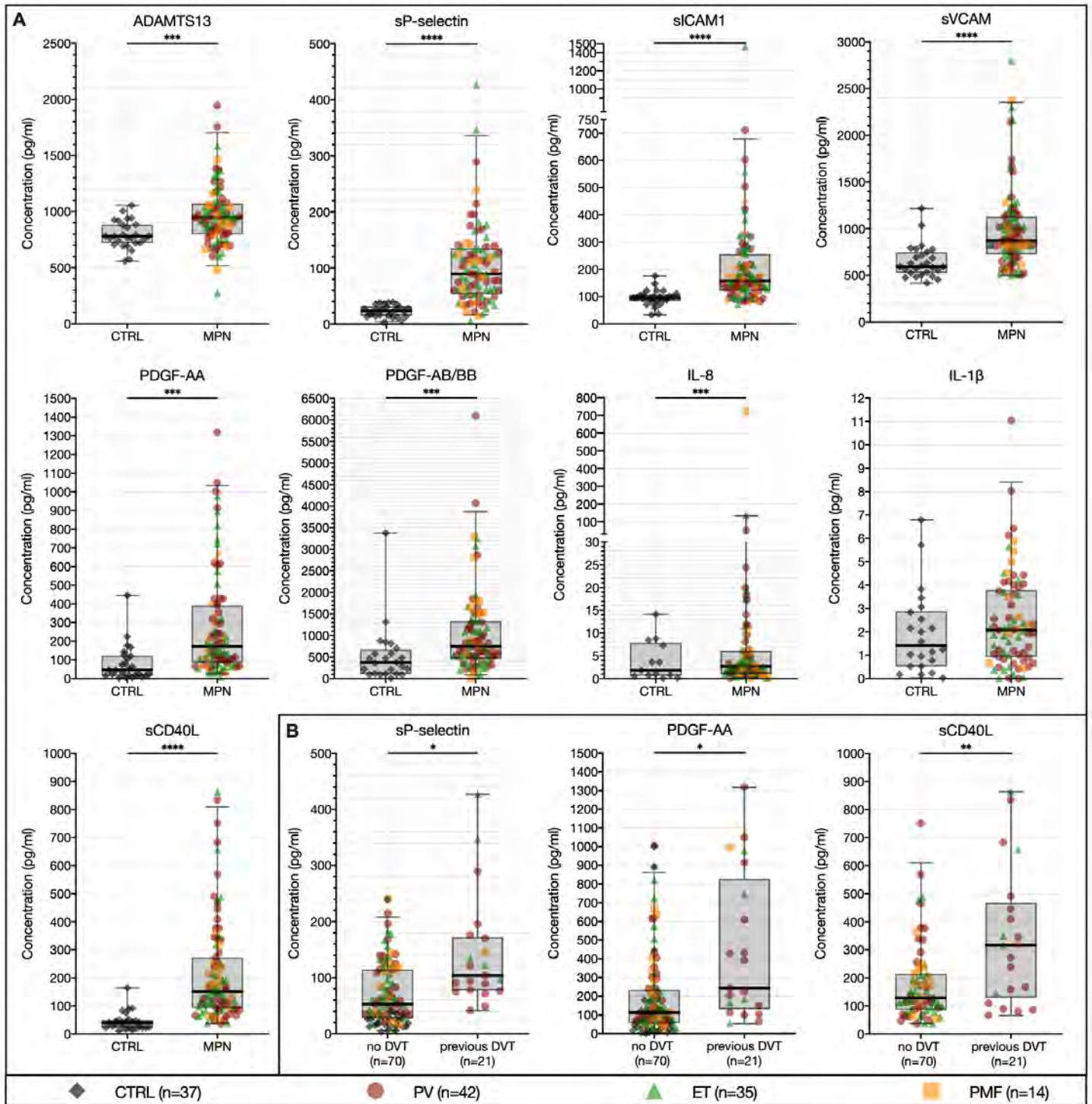


Figure 3



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1 – Taqman assay used in *JAK2V617F* RQ-PCR

SNP	Sequence [VIC/FAM]
rs77375493	TTTGGTTTTAAATTATGGAGTATGT[G/T]TCTGTGGAGACGAGAG-TAAGTAAAA

Table S2 – Primers used in *JAK2V617F* RFLP-PCR

Forward	(5'-(FAM) AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT-3')
Reverse	(5'-(HEX) CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTCAGTTTCA-3')

Table S3 – List of genes and regions covered by custom Ion Torrent amplicon-based library panel

Name	Chr	Chr_Start	Chr_End	Number of Amplicons	Total Bases	Covered Bases	Missed Bases	Overall Coverage	Exons
<i>ASXL1</i>	chr20	31021087	31021720	7	633	633	0	1	11
<i>ASXL1</i>	chr20	31022235	31027122	44	4887	4653	234	0.9521	
<i>BCOR</i>	chrX	.	.	58	5661	5419	242	0.9573	CDS
<i>BCORL1</i>	chrX	.	.	57	5256	5189	67	0.9873	CDS
<i>BOD1L</i>	chr4	.	.	106	9416	9031	385	0.9591	CDS
<i>BRAF</i>	chr7	140453075	140453193	2	118	118	0	1	15
<i>BRCC3</i>	chrX	154299800	154299925	2	125	125	0	1	1, 4
<i>BRCC3</i>	chrX	154305445	154305564	2	119	119	0	1	
<i>CALR</i>	chr19	13054527	13055304	7	777	672	105	0.865	9
<i>CBL</i>	chr11	.	.	37	2881	2794	87	0.9698	CDS
<i>CEBPA</i>	chr19	.	.	8	1087	799	288	0.7351	CDS
<i>CSF3R</i>	chr1	.	.	36	3555	3444	111	0.9688	CDS
<i>CUX1</i>	chr7	.	.	72	5896	5361	535	0.9093	CDS
<i>DNMT3A</i>	chr2	.	.	45	3385	3211	174	0.9486	CDS
<i>ETV6</i>	chr12	.	.	18	1439	1328	111	0.9229	CDS
<i>EZH2</i>	chr7	.	.	36	2732	2732	0	1	CDS
<i>FLT3</i>	chr13	.	.	49	3222	3167	55	0.9829	CDS
<i>GATA1</i>	chrX	48649498	48649736	2	238	193	45	0.811	2, 3
<i>GATA1</i>	chrX	48650251	48650628	4	377	315	62	0.836	
<i>GATA2</i>	chr3	.	.	15	1587	1479	108	0.9319	CDS
<i>GNAS</i>	chr20	.	.	45	6100	5371	729	0.8805	CDS
<i>GNB1</i>	chr1	.	.	15	1113	1113	0	1	CDS
<i>IDH1</i>	chr2	.	.	20	1325	1236	89	0.9328	CDS
<i>IDH2</i>	chr15	.	.	20	1469	1334	135	0.9081	CDS
<i>JAK2</i>	chr9	.	.	52	3629	3596	33	0.9909	CDS
<i>KDM6A</i>	chrX	.	.	62	4496	4327	169	0.9624	CDS
<i>KIT</i>	chr4	55593384	55593490	1	106	106	0	1	8, 10, 11, 17
<i>KIT</i>	chr4	55593582	55593708	2	126	126	0	1	

<i>KIT</i>	chr4	55599236	55599358	1	122	122	0	1	
<i>KIT</i>	chr4	55589750	55589864	1	114	114	0	1	
<i>KRAS</i>	chr12	.	.	10	737	597	140	0.81	CDS
<i>MPL</i>	chr1	43814934	43815030	1	96	96	0	1	10
<i>NF-E2</i>	chr12	54688919	54689088	2	169	169	0	1	2, 3
<i>NF-E2</i>	chr12	54685891	54687165	12	1274	1269	5	0.9961	
<i>NF1</i>	chr17	.	.	132	9251	9150	101	0.9891	CDS
<i>NPM1</i>	chr5	.	.	17	1014	884	130	0.8718	CDS
<i>NRAS</i>	chr1	.	.	9	610	610	0	1	CDS
<i>PHF6</i>	chrX	.	.	18	1585	1585	0	1	CDS
									3, 7, 8, 13
<i>PTPN11</i>	chr12	112926828	112926979	2	151	151	0	1	
<i>PTPN11</i>	chr12	112888122	112888316	2	194	194	0	1	
<i>PTPN11</i>	chr12	112910748	112910844	2	96	96	0	1	
<i>PTPN11</i>	chr12	112915455	112915534	1	79	79	0	1	
<i>RAD21</i>	chr8	.	.	31	2026	1953	73	0.964	CDS
<i>RIT1</i>	chr1	.	.	11	710	710	0	1	CDS
<i>RUNX1</i>	chr21	.	.	20	1842	1731	111	0.9397	CDS
<i>SETBP1</i>	chr18	.	.	49	5040	4781	259	0.9486	CDS
<i>SF3B1</i>	chr2	.	.	63	4195	4154	41	0.9902	CDS
<i>SH2B3</i>	chr12	111855923	111856681	6	758	510	248	0.673	2
<i>SMC1A</i>	chrX	.	.	55	3952	3952	0	1	CDS
<i>SMC3</i>	chr10	.	.	60	3944	3813	131	0.9668	CDS
<i>SRSF2</i>	chr17	.	.	6	686	664	22	0.968	CDS
<i>STAG2</i>	chrX	.	.	68	4137	4072	65	0.9843	CDS
<i>TET2</i>	chr4	.	.	62	9607	9489	118	0.9877	CDS
<i>TLR2</i>	chr4	.	.	23	2365	2172	193	0.9184	CDS
<i>TP53</i>	chr17	.	.	22	1556	1556	0	1	CDS
<i>U2AF1</i>	chr21	.	.	16	920	920	0	1	CDS
<i>WT1</i>	chr11	32417803	32417953	2	150	150	0	1	7, 9
<i>WT1</i>	chr11	32413527	32413610	1	83	83	0	1	
<i>ZRSR2</i>	chrX	.	.	23	1559	1543	16	0.9897	CDS

Abbreviations: Chr: chromosome; CDS: coding sequences

Table S4 – Genes in the RNA PCR array PAHS-015ZA (Array I) for endothelial cell biology

<i>ACE</i>	<i>ADAM17</i>	<i>AGT</i>	<i>AGTR1</i>	<i>ALOX5</i>	<i>ANGPT1</i>	<i>ANXA5</i>
<i>APOE</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>CALCA</i>	<i>CASP1</i>	<i>CASP3</i>
<i>CAV1</i>	<i>CCL2</i>	<i>CCL5</i>	<i>CDH5</i>	<i>CFLAR</i>	<i>COL18A1</i>	<i>CX3CL1</i>
<i>EDN1</i>	<i>EDN2</i>	<i>EDNRA</i>	<i>ENG</i>	<i>F2F</i>	<i>F3</i>	<i>FAZ</i>
<i>FASLG</i>	<i>FGF1</i>	<i>FGF2</i>	<i>FLT1</i>	<i>FM1</i>	<i>HIF1A</i>	<i>HMOX1</i>
<i>ICAM1</i>	<i>IL11</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL3</i>	<i>IL6</i>	<i>IL7</i>	<i>ITGA5</i>
<i>ITGAV</i>	<i>ITGB1</i>	<i>ITGB3</i>	<i>KDR</i>	<i>KIT</i>	<i>KLK3</i>	<i>MMP1</i>
<i>MMP2</i>	<i>MMP9</i>	<i>NOS3</i>	<i>NPPB</i>	<i>NPR1</i>	<i>OCLN</i>	<i>PDGFRA</i>
<i>PECAM1</i>	<i>PF4</i>	<i>PGF</i>	<i>PLAT</i>	<i>PLAU</i>	<i>PLG</i>	<i>PROCR</i>
<i>PTGIS</i>	<i>PTGS2</i>	<i>PTK2</i>	<i>SELE</i>	<i>SELL</i>	<i>SELPLG</i>	<i>SERPINE1</i>
<i>SOD1</i>	<i>SPHK1</i>	<i>TEK</i>	<i>TFP1</i>	<i>TGFB1</i>	<i>THBD</i>	<i>THBS1</i>
<i>TIMP1</i>	<i>TNF</i>	<i>TNFS10</i>	<i>TYMP</i>	<i>VCAM1</i>	<i>VEGFA</i>	<i>VWF</i>

Table S5 – Genes in the RNA PCR array PAHS-014ZA (Array II) for signal transduction pathways

<i>ACSL3</i>	<i>ACSL4</i>	<i>ACSL5</i>	<i>ADM</i>	<i>ARNT</i>	<i>ATF4</i>	<i>AXIN2</i>
<i>BAX</i>	<i>BBC3</i>	<i>BCL2</i>	<i>BCL2A1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>BIRC3</i>	<i>BMP2</i>
<i>BMP4</i>	<i>BTG2</i>	<i>CA9</i>	<i>CCL5</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>CDKN1B</i>	<i>CEBPD</i>	<i>CPT2</i>	<i>CSF1</i>	<i>DAB2</i>	<i>EGFR</i>	<i>EMP1</i>
<i>EPO</i>	<i>FABP1</i>	<i>FAZ</i>	<i>FCER2</i>	<i>FOSL1</i>	<i>FTH1</i>	<i>GADD45A</i>
<i>GADD45B</i>	<i>GATA3</i>	<i>GCLC</i>	<i>GCLM</i>	<i>GSR</i>	<i>HERPUD1</i>	<i>HES1</i>
<i>HES5</i>	<i>HEY1</i>	<i>HEY2</i>	<i>HEYL</i>	<i>HMOX1</i>	<i>ICAM1</i>	<i>ID1</i>
<i>IFNG</i>	<i>IFRD1</i>	<i>IRF1</i>	<i>JAG1</i>	<i>LDHA</i>	<i>LFNG</i>	<i>LRG1</i>
<i>MCL1</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NQO1</i>	<i>OLR1</i>	<i>PCNA</i>
<i>PPARD</i>	<i>PTCH1</i>	<i>RB1</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>SLC27A4</i>	<i>SLC2A1</i>	<i>SOCS3</i>
<i>SORBS1</i>	<i>SQSTM1</i>	<i>STAT1</i>	<i>TNF</i>	<i>TNFSF10</i>	<i>TXN</i>	<i>TXNRD1</i>
<i>VEGFA</i>	<i>WISP1</i>	<i>WNT1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT3A</i>	<i>WNT5A</i>	<i>WNT6</i>

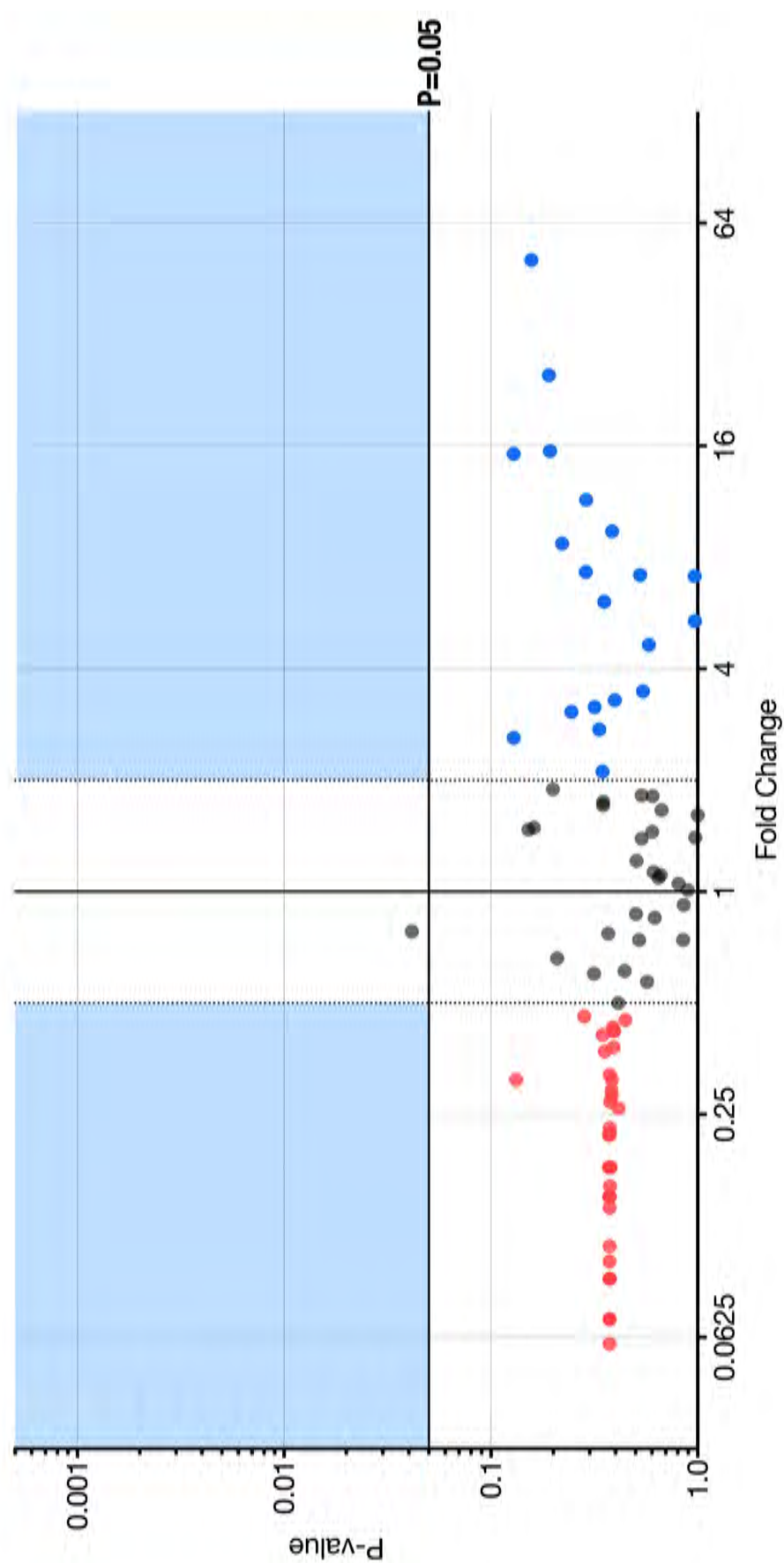


Figure S1 - Volcano plot depicting the fold change on the expression of 168 genes (Supplement) between ECFs from myeloproliferative neoplasms patients (MPN) and healthy individuals (CTRL). Red circles indicate overexpressed genes and blue genes indicate underexpressed genes. Light blue shaded areas correspond to genes with a significant fold change (< 0.5 or > 2) with a $P < 0.05$

**Critical appraisal of the clinical utility of NGS in triple negative essential
thrombocythemia: report of 21 cases and systematic review**

Bruno K L Duarte^{1,2}; Gabriela G Yamaguti-Hayakawa^{1,2}; Humberto V S Chaves², Lúcia H
Siqueira¹; Brooke Snetsinger³, Amy J M McNaughton³, Fernando F Costa^{1,2}; Kátia B B
Pagnano^{1,2} Michael J Rauh³ and Margareth C Ozelo^{1,2}

¹INCT do Sangue, Hemocentro UNICAMP, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

²Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, FCM
UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

³Department of Pathology and Molecular Medicine at Queen's University, Kingston, ON,
Canada

Running title: Clinical utility of NGS in TN ET

Total Word Count (without References): 1451

Abstract Word Count: 99

Number of Figures: 1

Number of Tables: 1

Number of References: 23

23 SUMMARY

24 A characteristic mutational profile has not been described in essential thrombocythemia (ET)
25 lacking mutations in *JAK2/MPL/CALR* (triple negative – TN). Here we used targeted next-
26 generation sequencing (NGS) in 21 ET patients deemed TN by PCR-based methods and
27 conducted a systematic review of sequencing results in this population. 4/18 patients from
28 our cohort had the following mutations: 2 *JAK2*V617F; 1 *MPL*S505N and W515R and 1 *CALR*
29 type II. In our systematic review, variants were detected in 138/447 patients, with *MPL* being
30 the most commonly mutated gene (35/138 patients). Given these results, clinical utility of
31 NGS in TN ET should be reconsidered.

32 **KEYWORDS:** myeloproliferative neoplasms; essential thrombocythemia; next-generation
33 sequencing; cancer genomics

34

35 INTRODUCTION

36 The identification of mutations in *CALR* as drivers in 30-40% of patients with primary myelo-
37 fibrosis (PMF) and essential thrombocythemia (ET) led to a better understanding and char-
38 acterization of these diseases, with the identification of a small subset of patients with no
39 particular driver mutation, the so-called triple negative (TN) patients (11, 142).

40 The prognostic impact of TN in PMF has been well established and further sequencing efforts
41 have identified a distinct genetic profile predictive of a worse survival (186). In TN ET, how-
42 ever, no specific genetic signature has been established (10, 151, 152, 187, 188).

43 Here, we report the results of targeted next-generation sequencing (NGS) of 21 patients with
44 suspected TN ET, where 4/18 patients with successful DNA amplification had either low allele

45 frequency mutations of *JAK2/MPL* or the larger type II indel of *CALR*. We also report the
46 results of a systematic review including 447 TN ET patients who underwent NGS, confirming
47 *MPL* as the most commonly mutated gene in this population.

48 **MATERIALS AND METHODS**

49 ***Patients***

50 We selected 21 ET patients negative for *JAK2V617F*; *CALR* type I and II and *MPLW515L/K*
51 mutations (TN) by fragment analysis polymerase chain reaction (PCR), diagnosed at our in-
52 stitution between 2007 and 2016. The research project was designed and conducted accord-
53 ing to the Declaration of Helsinki and was approved by our institutional ethics committee. All
54 patients gave their informed consent prior to study enrollment.

55 ***Sequencing***

56 We used targeted NGS for 48 recurrently mutated genes, using a custom, Ion Torrent Am-
57 pliSeq™ PCR panel (189) (Table S1) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). For *CUX1*,
58 the region of interest was sequenced by Sanger (Table S2). Pathogenicity was assessed with
59 standard *in silico* tools.

60 ***Systematic review***

61 We conducted a systematic review of the published reports of sequencing of TN ET. We
62 searched the following databases: EMBASE, Scopus, MEDLINE via PubMed, Cochrane Li-
63 brary and Web of Science. We used “sequencing” and “essential thrombocythemia” as
64 search terms and restricted our search to manuscripts in English, with full-text articles avail-
65 able, which reported on the results of DNA sequencing using either whole-exome sequencing
66 (WES), whole-genome sequencing or targeted NGS. We considered only reports where in-
67 dividual sequencing data were available, and where the source of DNA was granulocytes.
68 References of the identified articles were screened for additional reports. A flow-chart of the

search process is available in the online Support Information (Fig S1). All data regarding sequencing and the systematic review are available upon request.

RESULTS

Patients and sequencing results

We sequenced 21 TN ET patients (seqTN ET) from a larger group of 32 TN ET patients derived from a cohort of 145 ET patients. TN ET were younger, had lower hemoglobin levels and a lower prevalence of hypertension than *JAK2/MPL/CALR* mutated ET (median age: 36 vs. 52 years; $P<0.001$; median hemoglobin: 13.35 g/dl vs. 14.12 g/dl; $P=0.024$; hypertension: 21.9 vs. 55%, $P=0.001$). The incidence of cardiovascular events and venous thrombosis, as well as overall survival, was the same between both groups (Figure 1A). TN ET and seqTN ET had the same characteristics.

Table 1 summarizes patients' characteristics, variants detected and their potential pathogenicity. DNA amplification was not successful in 3/21 patients. 4/18 remaining patients had canonical mutations in the three classical driver genes: 2 had a *JAK2*V617F mutation with a low variant allele frequency (VAF), one had both an *MPL*S505N and W515R mutation at low VAF, and another a *CALR* type II mutation. The patient with both *MPL* mutations also had a *KIT*D816V and *TET2*A1192fs at higher VAF than *MPL*. She did not have any clinical signs of systemic mastocytosis nor eosinophilia. One patient with a *JAK2*V617F mutation (number 5) also had a *CUX1*A226T variant which was detected in germline DNA from saliva (analyzed with Sanger sequencing), suggesting its germline nature. The *CUX1*A226T variant was not detected in germline DNA samples from 105 healthy individuals. Finally, one patient had a *JAK2*R248T variant, which has an undetermined pathogenicity potential.

Systematic review

We identified 17 published articles reporting sequencing results in cohorts which included TN ET patients (10, 151-155, 187, 190-199). The work by Ju *et al.*, (196) was not included because it did not report sequencing results at the individual level. These reports varied widely in the panels used and in the coverage of *JAK2*, *MPL*, and *CALR* (Table S3). Briefly, 14/16 used targeted NGS, while 2/16 used WES. *JAK2/MPL/CALR* were fully sequenced in 6/16 and 5/16 did not report on the coverage of these genes. Most publications included variants with a low or intermediate potential of pathogenicity and given the criteria used for these assessments were not fully described, we chose to include all reported variants, except for the synonymous substitutions.

Overall, including our data, we identified 447 patients, with 225 mutations in 65 genes, of which only 20 were mutated in more than 1 patient. Only 138/447 (30.8%) of patients harbored one or more variants (Figure 1B). The most commonly mutated gene was *MPL*, which was mutated in 35/138 (25%) of patients with a detected variant (Figure 1C and D). S204 was the most common *MPL* mutation (12/35), followed by W515 (9/35), and by S505N (6/35). A *JAK2* mutation was also reported in 16/138 (11.6%) of TN ET patients, 6/16 being V617F. Taken together, *MPL* and *JAK2* were mutated in 46/138 (33%) of the sequenced TN ET patients from our systematic review.

DISCUSSION

We've presented the results of targeted NGS in 21 patients with TN ET where 4/21 harbored canonical mutations in the classical drivers of myeloproliferative neoplasms (MPN). These findings were confirmed by a systematic review which showed that *MPL* variants are the most common sequencing finding in TN ET, with the S204 mutation accounting for 1/3 of the mutations this gene.

115 S204X is not a canonical *MPL* mutation but has already been shown to be implicated in the
116 development of ET (10, 153). Most importantly, it is located in exon 4 and therefore not cov-
117 ered by the majority of available sequencing panels (including ours).

118 The widespread availability of NGS has brought great interest into the characterization of TN
119 MPN both for diagnostic and prognostic purposes. The largest cohort of MPN patients with
120 NGS data, involving 2035 patients, established a comprehensive prognostic model, highlight-
121 ing the negative impact of mutations in *TP53*, chromatin modifiers and splicing factors on OS,
122 ranging from a median of 12.1 to 25 years (10). The worst reported survival for ET in this
123 study, however, does not differ significantly from the median 14.7 years in unselected patients
124 (32). Furthermore, in our systematic review, the prevalence of mutations in genes carrying a
125 worse prognosis was 9.2%.

126 Taken together, despite the limitations in the scope of our own sequencing panel and in the
127 combination of sequencing findings from several studies using heterogeneous sequencing
128 techniques, the findings presented here suggest a critical reappraisal of the use of NGS in
129 TN ET. The low rate of patients with gene variants (<1/3 of patients), resulting in little or no
130 impact on survival renders its results of uncertain diagnostic and prognostic value. Moreover,
131 the considerable prevalence of *MPL* and *JAK2* mutations, particularly *MPL* S204P (as high
132 as 10% of all TN ET patients, as reported by Cabagnols *et al.* (153)), which is outside of the
133 coverage of conventional sequencing panels, should prompt a review in their design for this
134 specific use, possibly focusing on a more deep and broad sequencing of all coding exons of
135 these genes.

136 **ACKNOWLEDGMENTS**

137 This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
138 São Paulo (FAPESP), Grant Number 2014/00984-3 and from Coordenação de

139 Aperfeiçoamento de Pessoal e de Nível superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001 to
 140 M.C.O., and from the Ontario Institute for Cancer Research and Southeastern Ontario Aca-
 141 demic Medical Organization to M.J.R.

142 Contribution: B.K.L.D., G.G.Y., K.B.B.P., H.V.S.C., L.H.S. B.S. and A.J.M.M. collected sam-
 143 ples and performed experiments. M.J.R., B.S. and B.K.L.D. analyzed the results. B.K.L.D.
 144 and G.G.Y. made the figures; B.K.L.D., G.G.Y., M.C.O., and M. J. R. designed the research.
 145 B. K. L. D. wrote the manuscript. G.G.Y., M.C.O., M.J.R., K.B.B.P. and F.F.C. reviewed the
 146 manuscript.

147 **CONFLICT-OF-INTEREST DISCLOSURE:**

148 The authors declare no competing financial interests.

149 **REFERENCES**

- 150 Acha, P., Xandri, M., Fuster-Tormo, F., Palomo, L., Xicoy, B., Cabezon, M., Marce, S.,
 151 Granada, I., Vela, D., Sagues, M., Boque, C., Plensa, E., Pineda, A., Feliu, E., Sole,
 152 F. & Zamora, L. (2019) Diagnostic and prognostic contribution of targeted NGS in
 153 patients with triple-negative myeloproliferative neoplasms. *American Journal of*
 154 *Hematology*, **94**, E264-E267.
- 155 Angona, A., Fernández-Rodríguez, C., Alvarez-Larrán, A., Camacho, L., Longarón, R.,
 156 Torres, E., Pairet, S., Besses, C. & Bellosillo, B. (2016) Molecular characterisation of
 157 triple negative essential thrombocythaemia patients by platelet analysis and targeted
 158 sequencing. *Blood Cancer Journal*, **6**, e463.
- 159 Asp, J., Andréasson, B., Hansson, U., Wasslavik, C., Abellsson, J., Johansson, P. &
 160 Palmqvist, L. (2016) Mutation status of essential thrombocythemia and primary
 161 myelofibrosis defines clinical outcome. *Haematologica*, **101**, e129-e132.
- 162 Ayalew, T., Terra, L.L., Paola, G., Christy, M.F., Giada, R., Yoseph, E., Annalisa, P., Curtis,
 163 A.H., Alessandro, P., Rhett, P.K., Carmela, M., Daniela, B., Tiziana, F., Animesh, P.,
 164 Naseema, G. & Alessandro, M.V. (2016) Targeted deep sequencing in polycythemia
 165 vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*, **1**, 21 30.

- 166 Barbui, T., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Boveri, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F.,
 167 d'Amore, E.S., Randi, M.L., Bertozzi, I., Marino, F., Vannucchi, A.M., Antonioli, E.,
 168 Carrai, V., Gisslinger, H., Buxhofer-Ausch, V., Mullauer, L., Carobbio, A., Gianatti, A.,
 169 Gangat, N., Hanson, C.A. & Tefferi, A. (2011) Survival and disease progression in
 170 essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic
 171 diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*, **29**, 3179-3184.
- 172 Beucher, A., Dib, M., Orvain, C., Bouvier, A., Jouanneau-Courville, R., Dobo, I., Cottin, L.,
 173 Guardiola, P., Rousselet, M.C., Blanchet, O., Hunault, M., Ugo, V. & Luque Paz, D.
 174 (2019) Next generation sequencing redefines a triple negative essential
 175 thrombocythaemia as double-positive with rare mutations on JAK2 V617 and MPL
 176 W515 hotspots. *Br J Haematol*, **186**, 785-788.
- 177 Boiocchi, L., Hasserjian, R.P., Pozdnyakova, O., Wong, W.J., Lennerz, J.K., Le, L.P., Dias-
 178 Santagata, D., Iafrate, A.J., Hobbs, G.S. & Nardi, V. (2019) Clinicopathological and
 179 molecular features of SF3B1-mutated myeloproliferative neoplasms. *Human*
 180 *Pathology*, **86**, 1-11.
- 181 Cabagnols, X., Favale, F., Pasquier, F., Messaoudi, K., Defour, J.P., Ianotto, J.C., Marzac,
 182 C., Le Couedic, J.P., Droin, N., Chachoua, I., Favier, R., Diop, M.K., Ugo, V.,
 183 Casadevall, N., Debili, N., Raslova, H., Bellan e-Chantelot, C., Constantinescu, S.N.,
 184 Bluteau, O., Plo, I. & Vainchenker, W. (2016) Presence of atypical thrombopoietin
 185 receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients.
 186 *Blood*, **127**, 333-342.
- 187 Chang, Y.C., Lin, H.C., Chiang, Y.H., Chen, C.G.S., Huang, L., Wang, W.T., Cheng, C.C.,
 188 Lin, J., Chang, Y.F., Chang, M.C., Hsieh, R.K., Chen, S.J., Lim, K.H. & Kuo, Y.Y.
 189 (2017) Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-
 190 negative myeloproliferative neoplasms. *Medical Oncology*, **34**.
- 191 Delic, S., Rose, D., Kern, W., Nadarajah, N., Haferlach, C., Haferlach, T. & Meggendorfer,
 192 M. (2016) Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative
 193 neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary
 194 myelofibrosis and polycythaemia vera. *Br J Haematol*, **175**, 419-426.
- 195 Grinfeld, J., Nangalia, J., Baxter, E.J., Wedge, D.C., Angelopoulos, N., Cantrill, R., Godfrey,
 196 A.L., Papaemmanuil, E., Gundem, G., MacLean, C., Cook, J., O'Neil, L., O'Meara, S.,
 197 Teague, J.W., Butler, A.P., Massie, C.E., Williams, N., Nice, F.L., Andersen, C.L.,
 198 Hasselbalch, H.C., Guglielmelli, P., McMullin, M.F., Vannucchi, A.M., Harrison, C.N.,

- 199 Gerstung, M., Green, A.R. & Campbell, P.J. (2018) Classification and Personalized
200 Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*, **379**, 1416-1430.
- 201 Guo, B., Allcock, R.J., Mirzai, B., Malherbe, J.A., Choudry, F.A., Frontini, M., Chuah, H.,
202 Liang, J., Kavanagh, S.E., Howman, R., Ouwehand, W.H., Fuller, K.A. & Erber, W.N.
203 (2017) Megakaryocytes in Myeloproliferative Neoplasms Have Unique Somatic
204 Mutations. *American Journal of Pathology*, **187**, 1512-1522.
- 205 Ju, M., Fu, R., Li, H., Liu, X., Xue, F., Chen, Y., Liu, W., Huang, Y., Zhang, L. & Yang, R.
206 (2018) Mutation profiling by targeted sequencing of “triple-negative” essential
207 thrombocythaemia patients. *British Journal of Haematology*, **181**, 857-860.
- 208 Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A.S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J.D., Them,
209 N.C.C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Chen, D., Vladimer, G.I., Bagienski, K.,
210 Milanesi, C., Casetti, I.C., Sant'Antonio, E., Ferretti, V., Elena, C., Schischlik, F.,
211 Cleary, C., Six, M., Schalling, M., Schoñegger, A., Bock, C., Malcovati, L., Pascutto,
212 C., Superti-Furga, G., Cazzola, M. & Kralovics, R. (2013) Somatic mutations of
213 calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, **369**,
214 2379-2390.
- 215 Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S.,
216 Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., Beisel, C., Kralovics, R. & Skoda, R.C. (2014)
217 Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative
218 neoplasms. *Blood*, **123**, 2220-2228.
- 219 Magor, G.W., Tallack, M.R., Klose, N.M., Taylor, D., Korbie, D., Mollee, P., Trau, M. &
220 Perkins, A.C. (2016) Rapid Molecular Profiling of Myeloproliferative Neoplasms Using
221 Targeted Exon Resequencing of 86 Genes Involved in JAK-STAT Signaling and
222 Epigenetic Regulation. *Journal of Molecular Diagnostics*, **18**, 707-718.
- 223 Milosevic Feenstra, J.D., Nivarthi, H., Gisslinger, H., Leroy, E., Rumi, E., Chachoua, I.,
224 Bagienski, K., Kubesova, B., Pietra, D., Gisslinger, B., Milanesi, C., Ager, R.J., Chen,
225 D., Berg, T., Schalling, M., Schuster, M., Bock, C., Constantinescu, S.N., Cazzola, M.
226 & Kralovics, R. (2016) Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2
227 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **127**, 325-332.
- 228 Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E.J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E.,
229 Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., Aziz, A., Godfrey, A.L., Hinton, J., Martincorena, I.,
230 Van Loo, P., Jones, A.V., Guglielmelli, P., Tarpey, P., Harding, H.P., Fitzpatrick, J.D.,
231 Goudie, C.T., Ortmann, C.A., Loughran, S.J., Raine, K., Jones, D.R., Butler, A.P.,
232 Teague, J.W., O'Meara, S., McLaren, S., Bianchi, M., Silber, Y., Dimitropoulou, D.,

Bloxham, D., Mudie, L., Maddison, M., Robinson, B., Keohane, C., Maclean, C., Hill, K., Orchard, K., Tauro, S., Du, M.Q., Greaves, M., Bowen, D., Huntly, B.J.P., Harrison, C.N., Cross, N.C.P., Ron, D., Vannucchi, A.M., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J. & Green, A.R. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*, **369**, 2391-2405.

Paz, D.L., Mansier, O., Riou, J., Conejero, C., Roy, L., Belkhodja, C., Ugo, V. & Giraudier, S. (2019) Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: A single center prospective cohort experience. *Haematologica*, **104**, e134-e137.

Sekeres, M.A., Othus, M., List, A.F., Odenike, O., Stone, R.M., Gore, S.D., Litzow, M.R., Buckstein, R., Fang, M., Roulston, D., Bloomfield, C.D., Moseley, A., Nazha, A., Zhang, Y., Velasco, M.R., Gaur, R., Atallah, E., Attar, E.C., Cook, E.K., Cull, A.H., Rauh, M.J., Appelbaum, F.R. & Erba, H.P. (2017) Randomized Phase II Study of Azacitidine Alone or in Combination With Lenalidomide or With Vorinostat in Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia: North American Intergroup Study SWOG S1117. *J Clin Oncol*, JCO2015662510.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Finke, C.M., Rotunno, G., Elala, Y., Pacilli, A., Hanson, C.A., Pancrazzi, A., Ketterling, R.P., Mannarelli, C., Barraco, D., Fanelli, T., Pardananani, A., Gangat, N. & Vannucchi, A.M. (2016) Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Advances*, **1**, 21-30.

Vannucchi, A.M., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Biamonte, F., Pardananani, A., Pereira, A., Finke, C., Score, J., Gangat, N., Mannarelli, C., Ketterling, R.P., Rotunno, G., Knudson, R.A., Susini, M.C., Laborde, R.R., Spolverini, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Manfredini, R., Tagliafico, E., Zini, R., Jones, A., Zoi, K., Reiter, A., Duncombe, A., Pietra, D., Rumi, E., Cervantes, F., Barosi, G., Cazzola, M., Cross, N.C. & Tefferi, A. (2013) Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*, **27**, 1861-1869.

Zaidi, U., Shahid, S., Fatima, N., Ahmed, S., Sufaida, G., Nadeem, M. & Shamsi, T. (2017) Genomic profile of a patient with triple negative essential thrombocythemia, unresponsive to therapy: A case report and literature review. *Journal of Advanced Research*, **8**, 375-378.

TABLE 1 – Clinical characteristics at diagnosis and sequencing results of negative essential thrombocythemia patients with detected variants (classical mutation in MPN driver genes are in bold)

Patient	Age	Gender	Hb	Ht	Lo	Plt	Venous thrombosis	Arterial thrombosis	Cytogenetics	Variants (VAF)	SIFT	PolyPhen-2	MutationTaster
1	22	Female	14.8	43.8	11.7	908	No	No	46,XX	<i>TET2</i>	Tolerated (0.07)	Possibly damaging (0.718)	Polymorphism
										G429R (53.92)			
2	33	Female	13.5	42.7	8.4	1185	No	No	46,XX	<i>CSF3R</i>	Tolerated (0.48)	Benign (0.07)	Polymorphism
										R440Q (38.82)			
3	31	Female	12	37.4	9.9	1464	No	No	No metaphases	<i>NF1</i>	Tolerated (0.5)	Benign (0.013)	Disease causing
										K233Q (45.75)			
4	86	Female	12.8	39.9	6.7	634	Yes, CRVO	Yes, stroke	46, XX	<i>MPL</i>	Deleterious (0.05)	Benign (0.02)	Disease causing
										S505N (3.08)			
										<i>MPL</i>	Deleterious (0.0)	Benign (0.003)	Disease causing
										W515R (9.95)			
										<i>KIT</i>	Deleterious (0.0)	Damaging (0.991)	Disease causing
										D816V (25.96)			
										<i>TET2</i>	NA	NA	Disease causing
										A1196fs (45.26)			
5	48	Female	15.4	40.7	11.3	727	No	No	46, XY	<i>JAK2</i>	Deleterious (0.0)	Damaging (0.996)	Disease causing
										V617F (4.67)			
										<i>CUX1</i>	Tolerated (0.16)	Damaging (0.993)	Disease causing

12	47	Female	12.7	40.1	11.8	984	No	No	No metaphases	R1316H (48.1)	Tolerated (0.22)	Damaging (0.941)	Polymorphism
15	72	Female	13.8	40.9	4.2	436	No	No	46, XX	K385fs (43.75)	NA	NA	Disease causing
16	35	Female	14.3	42.5	9	1143	No	No	46, XX	JAK2 R248T (45.21)	Tolerated (0.35)	Possibly da- maging (0.704)	Disease causing
19	19	Male	16.4	47.9	9.5	656	No	No	46, XY	SMC F576L (48.85)	Tolerated (1.0)	Benign (0.023)	Disease causing
21	36	Female	13.3	42.7	14.7	793	Yes, CVT	No	46, XX	JAK2 V617F (5.72)	Deleterious (0.0)	Damaging (0.996)	Disease causing

Abbreviations: **CRVO**: central retinal vein obstruction; **CVT**: cerebral vein thrombosis; **Hb**: hemoglobin, in g/dl; **Ht**: hematocrit, in %; **Lo**: leukocytes count in $\times 10^3/\mu\text{l}$; **Plt**: platelets count in $\times 10^3/\mu\text{l}$; **PolyPhen-2**: Polymorphism Phenotyping; **SIFT**: scale-invariant feature transform; **VAF**: variant allele frequency in %

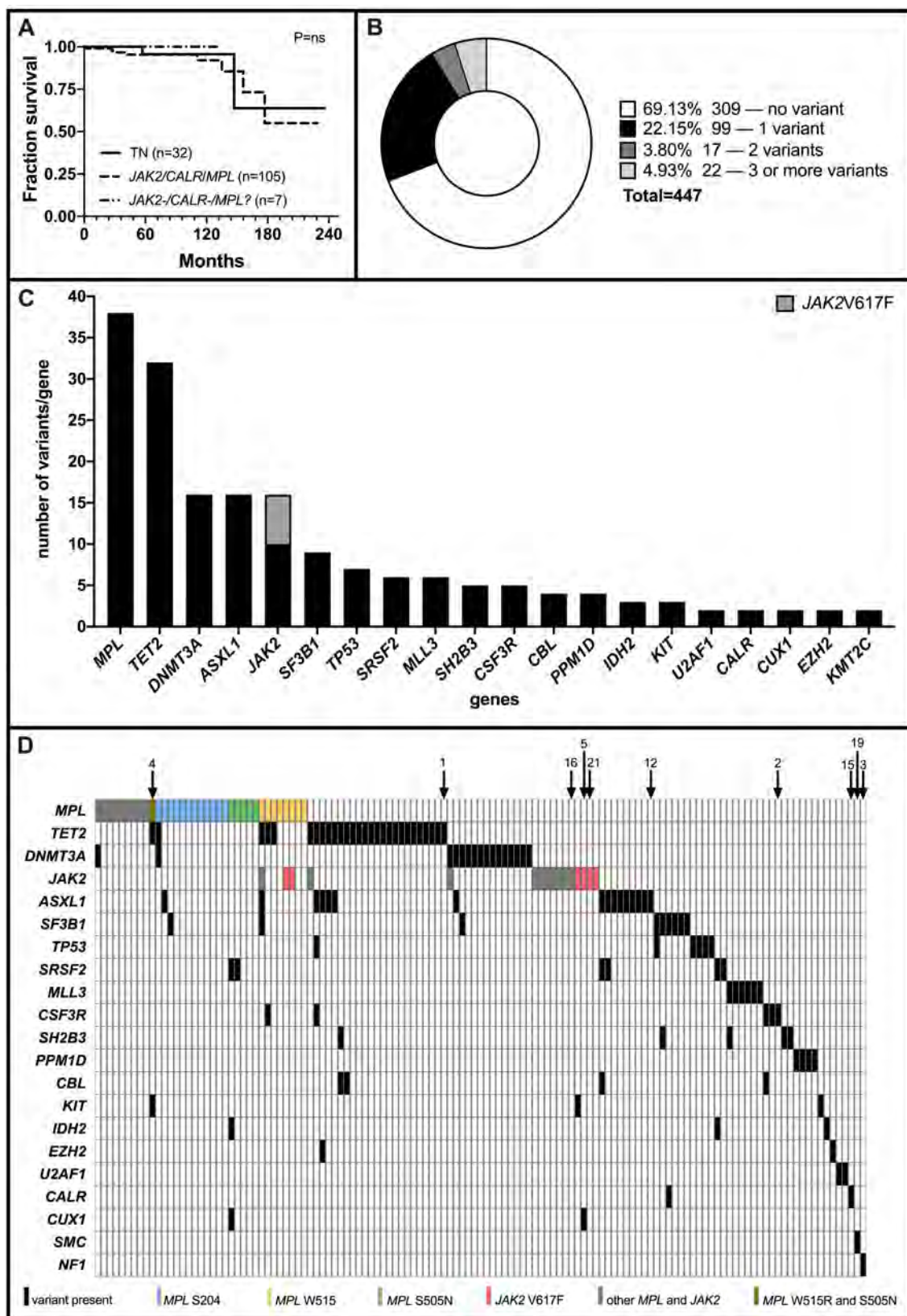
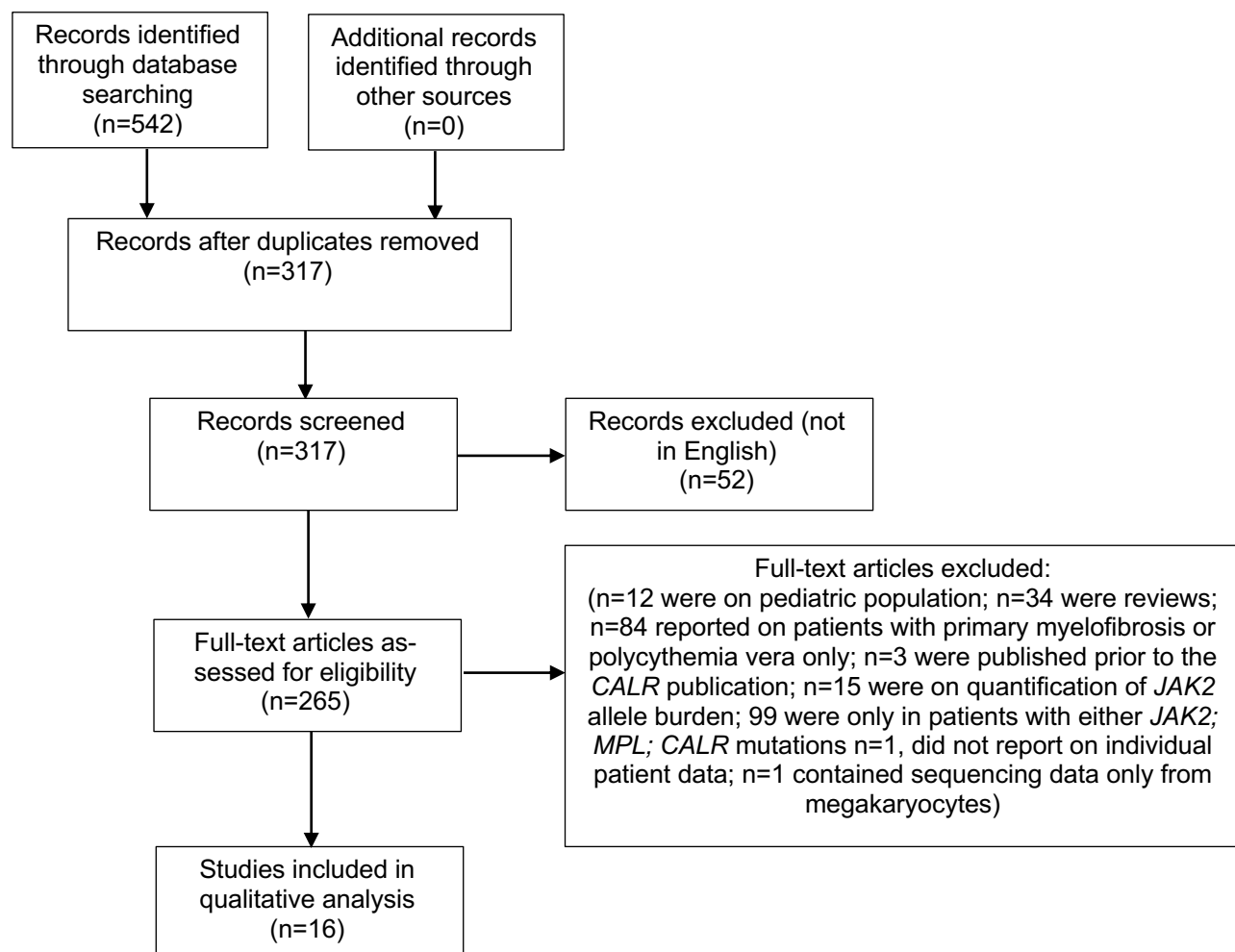


Figure 1: Sequencing results from our cohort and from the systematic review. **A)** Overall survival of essential thrombocythemia patients in our cohort. TN: triple negative; JAK2/CALR/MPL: patients harboring mutations in one of these three genes; JAK2-/CALR-/MPL?: patients who tested negative for JAK2 and CALR mutations and were not tested for MPL mutations. ns: not statistically significant. **B)** Proportion of patients from the systematic review, including our cohort,

harboring no mutation, one mutation, two mutations or three or more mutations. **C)** Number of mutations per gene in the systematic review including patients from our cohort. Genes included in this graph are only those in which a mutation was reported twice or more. **D)** OncoPrint for patients from our cohort and from the systematic review. Genes included in this graph are only those in which a mutation was reported twice or more, or which were detected in patients from our cohort. Numbered arrows correspond to patients from our cohort who had a gene variant detected through next generation sequencing.

Supporting Information

Figure S1 – PRISMA Flow Diagram**Table S1 – List of genes and regions covered by custom Ion Torrent amplicon-based library panel**

Name	Chr	Chr_Start	Chr_End	Number of Amplicons	Total Bases	Covered Bases	Missed Bases	Overall Coverage	Exons
ASXL1	chr20	31021087	31021720	7	633	633	0	1	11
ASXL1	chr20	31022235	31027122	44	4887	4653	234	0.9521	
BCOR	chrX	.	.	58	5661	5419	242	0.9573	CDS
BCORL1	chrX	.	.	57	5256	5189	67	0.9873	CDS
BOD1L	chr4	.	.	106	9416	9031	385	0.9591	CDS
BRAF	chr7	140453075	140453193	2	118	118	0	1	15
BRCC3	chrX	154299800	154299925	2	125	125	0	1	1, 4
BRCC3	chrX	154305445	154305564	2	119	119	0	1	
CALR	chr19	13054527	13055304	7	777	672	105	0.865	9
CBL	chr11	.	.	37	2881	2794	87	0.9698	CDS
CEBPA	chr19	.	.	8	1087	799	288	0.7351	CDS
CSF3R	chr1	.	.	36	3555	3444	111	0.9688	CDS

<i>CUX1</i>	chr7	.	.	72	5896	5361	535	0.9093	CDS
<i>DNMT3A</i>	chr2	.	.	45	3385	3211	174	0.9486	CDS
<i>ETV6</i>	chr12	.	.	18	1439	1328	111	0.9229	CDS
<i>EZH2</i>	chr7	.	.	36	2732	2732	0	1	CDS
<i>FLT3</i>	chr13	.	.	49	3222	3167	55	0.9829	CDS
<i>GATA1</i>	chrX	48649498	48649736	2	238	193	45	0.811	2, 3
<i>GATA1</i>	chrX	48650251	48650628	4	377	315	62	0.836	
<i>GATA2</i>	chr3	.	.	15	1587	1479	108	0.9319	CDS
<i>GNAS</i>	chr20	.	.	45	6100	5371	729	0.8805	CDS
<i>GNB1</i>	chr1	.	.	15	1113	1113	0	1	CDS
<i>IDH1</i>	chr2	.	.	20	1325	1236	89	0.9328	CDS
<i>IDH2</i>	chr15	.	.	20	1469	1334	135	0.9081	CDS
<i>JAK2</i>	chr9	.	.	52	3629	3596	33	0.9909	CDS
<i>KDM6A</i>	chrX	.	.	62	4496	4327	169	0.9624	CDS
									8, 10, 11, 17
<i>KIT</i>	chr4	55593384	55593490	1	106	106	0	1	
<i>KIT</i>	chr4	55593582	55593708	2	126	126	0	1	
<i>KIT</i>	chr4	55599236	55599358	1	122	122	0	1	
<i>KIT</i>	chr4	55589750	55589864	1	114	114	0	1	
<i>KRAS</i>	chr12	.	.	10	737	597	140	0.81	CDS
<i>MPL</i>	chr1	43814934	43815030	1	96	96	0	1	10
<i>NF-E2</i>	chr12	54688919	54689088	2	169	169	0	1	2, 3
<i>NF-E2</i>	chr12	54685891	54687165	12	1274	1269	5	0.9961	
<i>NF1</i>	chr17	.	.	132	9251	9150	101	0.9891	CDS
<i>NPM1</i>	chr5	.	.	17	1014	884	130	0.8718	CDS
<i>NRAS</i>	chr1	.	.	9	610	610	0	1	CDS
<i>PHF6</i>	chrX	.	.	18	1585	1585	0	1	CDS
									3, 7, 8, 13
<i>PTPN11</i>	chr12	112926828	112926979	2	151	151	0	1	
<i>PTPN11</i>	chr12	112888122	112888316	2	194	194	0	1	
<i>PTPN11</i>	chr12	112910748	112910844	2	96	96	0	1	
<i>PTPN11</i>	chr12	112915455	112915534	1	79	79	0	1	
<i>RAD21</i>	chr8	.	.	31	2026	1953	73	0.964	CDS
<i>RIT1</i>	chr1	.	.	11	710	710	0	1	CDS
<i>RUNX1</i>	chr21	.	.	20	1842	1731	111	0.9397	CDS
<i>SETBP1</i>	chr18	.	.	49	5040	4781	259	0.9486	CDS
<i>SF3B1</i>	chr2	.	.	63	4195	4154	41	0.9902	CDS
<i>SH2B3</i>	chr12	111855923	111856681	6	758	510	248	0.673	2
<i>SMC1A</i>	chrX	.	.	55	3952	3952	0	1	CDS
<i>SMC3</i>	chr10	.	.	60	3944	3813	131	0.9668	CDS
<i>SRSF2</i>	chr17	.	.	6	686	664	22	0.968	CDS
<i>STAG2</i>	chrX	.	.	68	4137	4072	65	0.9843	CDS
<i>TET2</i>	chr4	.	.	62	9607	9489	118	0.9877	CDS
<i>TLR2</i>	chr4	.	.	23	2365	2172	193	0.9184	CDS

<i>TP53</i>	chr17	.	.	22	1556	1556	0	1	CDS
<i>U2AF1</i>	chr21	.	.	16	920	920	0	1	CDS
<i>WT1</i>	chr11	32417803	32417953	2	150	150	0	1	7, 9
<i>WT1</i>	chr11	32413527	32413610	1	83	83	0	1	
<i>ZRSR2</i>	chrX	.	.	23	1559	1543	16	0.9897	CDS

Abbreviations: Chr: chromossome; **CDS:** coding sequences

Table S2 – Primers used in Sanger Sequencing

Genes	Forward	Reverse
<i>CUX1</i>	5' TGGCATCAGCAAGCACATCTC 3'	5' GATAACCGGCCTTCTAACTTCG 3'

Table S3 – Number of essential thrombocythemia patients (ET) and sequencing strategies of the studies selected for the systematic review

Reference	Population	Sequencing methods
Acha, P., Xandri, M., Fuster-Tormo, F., Palomo, L., Xicoy, B., Cabezon, M., Marce, S., Granada, I., Vela, D., Sagues, M., Boque, C., Plensa, E., Pineda, A., Feliu, E., Sole, F. & Zamora, L. (2019) Diagnostic and prognostic contribution of targeted NGS in patients with triple-negative myeloproliferative neoplasms. <i>American Journal of Hematology</i> , 94 , E264-E267.	35 triple negative ET patients	Targeted next-generation sequencing (NGS) with the following genes: <i>ASXL1</i> ; <i>CALR</i> (only exon 9); <i>CBL</i> ; <i>DNMT3A</i> ; <i>EZH2</i> ; <i>IDH1</i> ; <i>IDH2</i> ; <i>IKZF1</i> , <i>JAK2</i> (exons 3 through 25), <i>MPL</i> (all exons); <i>NRAS</i> ; <i>SF3B1</i> ; <i>SH2B3</i> ; <i>SRSF2</i> ; <i>TET2</i> ; <i>TP53</i> ; <i>U2AF1</i> .
Alduaij, W., McNamara, C.J., Schuh, A., Arruda, A., Sukhai, M., Kanwar, N., Thomas, M., Spiegel, J., Kennedy, J.A., Stockley, T., Tsui, H., Devlin, R., Sibai, H., Maze, D., Schimmer, A., Yee, K., Chan, S., Kamel-Reid, S. & Gupta, V. (2018) Clinical Utility of Next-generation Sequencing in the Management of Myeloproliferative Neoplasms: A Single-Center Experience. <i>HemaSphere</i> , 2 , e44-e44.	1 triple negative ET patient	Targeted NGS with the TruSight Myeloid Sequencing Panel (Illumina).
Angona, A., Fernández-Rodríguez, C., Alvarez-Larrán, A., Camacho, L., Longarón, R., Torres, E., Pairet, S., Besses, C. & Bellosillo, B. (2016) Molecular characterisation of triple negative essential thrombocythaemia patients by platelet analysis and targeted sequencing. <i>Blood Cancer Journal</i> , 6 , e463.	35 triple negative ET patients (35 for RNA extraction from megakaryocytes and 29 from granulocytes).	RNA extracted from patients' megakaryocytes and was submitted to quantitative allele-specific real time PCR from <i>JAK2V617F</i> , NGS for sequencing of the exon 10 of <i>MPL</i> and either restriction fragment length polymorphism PCR or NGS deep sequencing for the exon 9 of <i>CALR</i> . RNA from granulocytes was sequenced by targeted NGS (analyzed genes were not specified).
Asp, J., Andréasson, B., Hansson, U., Wasslavič, C., Abellsson, J., Johansson, P. & Palmqvist, L. (2016) Mutation status of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis defines clinical outcome. <i>Haematologica</i> , 101 , e129-e132.	12 triple negative ET patients (4 of which were found to harbor <i>MPL</i> mutations after NGS and were assigned as <i>MPL</i> mutated for the prognosis analysis).	Targeted NGS with the TruSight Myeloid Sequencing Panel (Illumina).

Beucher, A., Dib, M., Orvain, C., Bouvier, A., Jouanneau-Courville, R., Dobo, I., Cottin, L., Guardiola, P., Rousset, M.C., Blanchet, O., Huanault, M., Ugo, V. & Luque Paz, D. (2019) Next generation sequencing redefines a triple negative essential thrombocythaemia as double-positive with rare mutations on JAK2 V617 and MPL W515 hotspots. <i>Br J Haematol</i> , 186 , 785-788.	1 triple negative ET	Targeted NGS with the a 69-gene panel (no mention to the genes included in the panel)
Boiocchi, L., Hasserjian, R.P., Pozdnyakova, O., Wong, W.J., Lennerz, J.K., Le, L.P., Dias-Santagata, D., Iafrate, A.J., Hobbs, G.S. & Nardi, V. (2019) Clinicopathological and molecular features of SF3B1-mutated myeloproliferative neoplasms. <i>Human Pathology</i> , 86 , 1-11.	1 triple negative ET patient	Targeted NGS with the Rapid Heme panel, a custom, Illumina-TSCA-based sequencing panel including 95 genes: <i>ABL1</i> ; <i>ASXL1</i> ; <i>ATM</i> ; <i>BCL11B</i> ; <i>BCOR</i> ; <i>BCORL1</i> ; <i>BRAF</i> ; <i>BRCC3</i> ; <i>CALR</i> (only exon 9); <i>CBL</i> ; <i>CBLB</i> ; <i>CD79B</i> ; <i>CEBPA</i> ; <i>CNOT3</i> ; <i>CREBBP</i> ; <i>CRLF2</i> ; <i>CSF1R</i> ; <i>CSF3R</i> ; <i>CTCF</i> ; <i>CTNNB1</i> ; <i>CUX1</i> ; <i>CXCR4</i> ; <i>DNMT3A</i> ; <i>DNMT3B</i> ; <i>EED</i> ; <i>EGFR</i> ; <i>EP300</i> ; <i>ETV6</i> ; <i>FANCL</i> ; <i>FBXW7</i> ; <i>EZH2</i> ; <i>FLT3</i> ; <i>GATA1</i> ; <i>GATA2</i> ; <i>GATA3</i> ; <i>GNAS</i> ; <i>GNB1</i> ; <i>IDH1</i> ; <i>IDH2</i> ; <i>IKZF1</i> ; <i>IKZF2</i> ; <i>IKZF3</i> ; <i>IL7R</i> ; <i>JAK1</i> ; <i>JAK2</i> (exons 12 and 14); <i>JAK3</i> ; <i>KIT</i> ; <i>KRAS</i> ; <i>LUC7L2</i> ; <i>MAP2K1</i> ; <i>MEF2B</i> ; <i>MPL</i> (only exon 10); <i>MYD88</i> ; <i>NOTCH1</i> ; <i>NOTCH2</i> ; <i>NOTCH3</i> ; <i>NOTCH3</i> ; <i>NPM1</i> ; <i>NRAS</i> ; <i>PAX5</i> ; <i>NT5C2</i> ; <i>PDS5B</i> ; <i>PHF6</i> ; <i>PDGFRA</i> ; <i>PIGA</i> ; <i>PIM1</i> ; <i>PRPF40B</i> ; <i>PIK3CA</i> ; <i>PRPF8</i> ; <i>PTEN</i> ; <i>PTPN11</i> ; <i>RAD21</i> ; <i>RET</i> ; <i>RIT1</i> ; <i>RPL10</i> ; <i>RUNX1</i> ; <i>ETBP1</i> ; <i>SF3B1</i> ; <i>SF1</i> ; <i>SF3A1</i> ; <i>SETD2</i> ; <i>SH2B3</i> ; <i>SMC1A</i> ; <i>SMC3</i> ; <i>SRSF2</i> ; <i>STAG2</i> ; <i>TET2</i> ; <i>STAT3</i> ; <i>TLR2</i> ; <i>TP53</i> ; <i>U2AF1</i> ; <i>U2AF2</i> ; <i>HSC1</i> ; <i>WT1</i> ; <i>XPO1</i> ; <i>ZRSR2</i>
Cabagnols, X., Favale, F., Pasquier, F., Messaoudi, K., Defour, J.P., Ianotto, J.C., Marzac, C., Le Couedic, J.P., Droin, N., Chachoua, I., Favier, R., Diop, M.K., Ugo, V., Casadevall, N., Debili, N., Raslova, H., Bellanhe-Chantelot, C., Constantinescu, S.N., Bluteau, O., Plo, I. & Vainchenker, W. (2016) Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. <i>Blood</i> , 127 , 333-342.	17 triple negative ET patients on the WES and JAK2/MPL cohorts + 26 patients in the JAK2/MPL patients	Whole-exome sequencing for the first 17 patients and NGS in all exons of <i>JAK2/MPL</i> of 26 patients.
Chang, Y.C., Lin, H.C., Chiang, Y.H., Chen, C.G.S., Huang, L., Wang, W.T., Cheng, C.C., Lin, J., Chang, Y.F., Chang, M.C., Hsieh, R.K., Chen, S.J., Lim, K.H. & Kuo, Y.Y. (2017) Targeted next-	7 triple negative ET patients	Targeted NGS for 409 cancer-related genes (including all coding sequences from <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> and <i>CALR</i>) using the ACTOnco Comprehensive Cancer Panel (Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel, Life Technologies)

generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. <i>Medical Oncology</i> , 34 .		
Delic, S., Rose, D., Kern, W., Nadarajah, N., Haferlach, C., Haferlach, T. & Meggendorfer, M. (2016) Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. <i>Br J Haematol</i> , 175 , 419-426.	7 triple negative ET patients	Targeted NGS for hotspots in 27 genes: ASXL1; BCOR; BCORL1; BRAF; CALR; CBL; CEBPA; DNMT3A; ETV6; EZH2; FLT3-TKD; GATA1; GATA2; IDH1; IDH2; JAK2; KDM6A; KIT; KRAS; MPL; NOTCH1; NPM1; NRAS; PHF6; PRPF40B; PTPN11; RAD21; RUNX1; SETBP1; SF1; SF3A1; SF3B1; SH2B3; SMC1A; SMC3; SRSF2; STAG2; TET2; TP53; U2AF1; U2AF2; WT1; ZRSR2. No information about JAK2; MPL and CALR coverage.
Grinfeld, J., Nangalia, J., Baxter, E.J., Wedge, D.C., Angelopoulos, N., Cantrell, R., Godfrey, A.L., Papaemmanuil, E., Gundem, G., MacLean, C., Cook, J., O'Neil, L., O'Meara, S., Teague, J.W., Butler, A.P., Massie, C.E., Williams, N., Nice, F.L., Andersen, C.L., Hasselbalch, H.C., Guglielmelli, P., McMullin, M.F., Vannucchi, A.M., Harrison, C.N., Gerstung, M., Green, A.R. & Campbell, P.J. (2018) Classification and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. <i>New England Journal of Medicine</i> , 379 , 1416-1430.	211 triple negative ET patients	Targeted NGS for all coding sequences in 68 genes: ASXL1; EP300; KSR2; PTEN; ASXL3; ETV6; MBD1; PTPN11; ATRX; EZH2; MLL; RAD21; BCOR; FAM47C; MLL2; RAD51; BRAF; FARS2; MLL3; RB1; C2ORF39; FLT3; MLL5; RUNX1; CACNA2D3; GATA2; MPL; SARDH; CALR; GNAS; NCL; SETBP1; CBL; GNB1; NF1; SF3B1; CDKN2A; GRIN2B; NFE2; SH2B3; CEBPA; IDH1; NOTCH2; SRSF2; CHEK2; IDH2; NPM1; STAG2; CREBBP; IRF1; NRAS; TET2; CUX1; JAK2; PCDH15; TP53; DNMT3A; KDM6A; PHF6; U2AF1; DNMT3B; KIT; PPM1D; WT1; ELF1; KRAS; PRKACB; WWOX; ZRSR2
Ju, M., Fu, R., Li, H., Liu, X., Xue, F., Chen, Y., Liu, W., Huang, Y., Zhang, L. & Yang, R. (2018) Mutation profiling by targeted sequencing of "triple-negative" essential thrombocythaemia patients. <i>Br J Haematol</i> , 181 , 857-860.	68 triple negative ET patients	Targeted NGS of 360 genes (no information about coverage of each gene) MUC4; TTN; PDE4DIP; MUC6; PRSS3P2; KCNJ12; KCNJ18; MUC12; CDC27; IGSF3; BCLAF1; CDH23; USH2A; FAM205A; SEC22B; WDR90; KMT2C; XIRP2; PKHD1; FOXD4; PRAMEF1; TPTE; NBPF9; SP110; PRSS2; KRT40; LILRA6; LILRB3; PCLO; ANKRD36B; TPO; NUGGC; OR141; EPPK1; SPTA1; FRG1; ADAM21; DNAH7; FAM120B; OR51A2; DDX11; ZNF479; PCDHB16; TTC3; TNF; GPATCH1; VWA5B1; CGNL1; MYO7A; CACNA1H; CD177; MYOM2; CNTN5; PRB1; PTPRB; TET1; CSMD1; NOTCH2NL; SYNC; PCMTD1; BNIP2; FAM86C1; OR2T33; KIF17; LRRC34; NBPF10; ZFXH3; GDF15; ANAPC1; OR10H3; VCX; LILRA3; CORIN; GREB1; SYNPO2; TCF4; KRTAP1-1; NSD1; SPEN; NBPF25P; SPATA31A6; KIF4B; MYO7B; SRGAP2; HEATR2; UVSSA; BMS1; ATP7A; BTNL8; MYO5A; FLT3; OR2T3; CD101; PRAMEF4; ZDHHC11; PDZD2; RGPD3; SH2B3; DNMT1; ASXL1;

		PIK3R2; SRGAP2B/C; ZNF675; PIK3C2G; KDM5A; LRP6; PIK3AP1; CSGAL-NACT1; ABCA12; ZNF595; NBPF20/9; ZNF492; AHDC1; MRPS7; PIK3IP1; IER3; ELF1; PTPRT; SH2D2A; HSP90AA1; NLRP1; OCA2; PIK3R3; RNF10; ADAMTS1; KRT6A; NAF1; TET2; CHGA; SFXN4; DSCAML1; OR5AC2; ANKRD20A4; ATRX; ZCCHC14; CEP55; CSF2; TP53; POTEH; EGFR; CUX1; PKD1L1; RBMXL1; CRIPAK; CYP4A11; HIF3A; KRTAP11-1; SPDYE1; GSN; NFASC; MTAP; OR11G2; HERC2; ACTR5; ICOS; TSNARE1; CTNNA3; PIK3R6; EID 2; ABCC5; GATA2; DNAH3; PCDHGA10; THBS1; KNG1; MC5R; TLL1; CSF1R; FANCD2; EGLN1; IL6R; FMN2; EPAS1; MYH3; TUBB1; ARHGAP26; RHPN2; AFTPH; ASIC2; PIK3CG; FAM47A; ATIC; OR11H12; RASA4B; SLC35E2; ATP9A; DDX18; NOL8; KDM6A; KRTAP4-6; MYBL2; MRPL12; FOXD4L1; GRIA3; LARP4; CLEC18B; GPR 182; NR5A1; PIK3R1; ZNF718; PPP2R 4; ABCC10; HEATR5B; CEP170; KMT2D; OR4D1; USPL1; HIF1A; MPL; MECOM; OR10H1; EP300; PDGFRA; PRKRIR; FAM21C; MET; RPL29; CDK11B; JAK2; KMT2E; THSD4; KMT2A; OXCT2; CBLB; EZH2; PTGER3; FOXPI1; IFI30; NRD1; PIK3R4; DCAKD; GNAS; NOTCH1; PAPP2; PIK3CD; SPATC1; STAG2; BCL2; IL6; NF1; TUBA3D; DUSP16; PIK3C2A; PIK3C2B; PKP3; SLC2A3; TMEM144; UNC80; WDFY3; ARSF; CBLC; KIAA1429; NUP98; SGK2; ABLIM1; ARNT2; CDKN1B; CREBBP; NCL; RINT1; SPI1; AKT1S1; CALR; KIT; MYOCD; OR1D5; RGN; STAT5B; ATXN7L1; CARD11; CDH1; CTNNA1; GPR32; KITLG; MAP2K5; NFKBIB; NOX1; ZRSR2; ABL1; BCOR; BRAF; CBL; DNMT3A; EIF2B3; EPOR; FA2H; IDH2; JAK3; JARID2; LCORL; PDE10A; PIK3CB; POGK; RAD50; SF1; SF3A1; TUBB2A; ATP5O; CE-BPA; EPO; FAM115C; LUC7L; MN1; NPEPPS; NPM1; PCDHAC2; PIAS1; PIAS3; PIK3R5; PRDX2; SOCS1; STAT3; STK17B; TMEM5; TUBB8; VPS37B; ZFP36L1; ZNF595/718; AKT1; AKT2; AKTIP; ARNT; CDC40; CDKN2A; CDKN2B; CXCL14; DHX9; DOK6; EID 1; FAM115A; FAM175B; FBXW7; GATA1; IDH1; IKZF1; INTS3; INVS; KCTD12; KLK15; RUNX1T1; L3MBTL1; SPARC; LILRA6; SPOPL; LILRB3; SPRR2E; MATN3; SUZ12; MYB; THPO; MYBL1; TROVE2; MYC; UBTD2; NFE2; USP1; OR1M1; WT1; RAD21; ZEB2; RB1 ZFP42
	10 triple negative ET patients	Targeted NGS for 104 genes (no information about coverage of each gene): AKT1; AKT1S1; AKT2; AKT3; AKTIP; AML1; ARNT; ARNT2; ARNTL; ARNTL2; ASXL1; BCL2; BRAF; CBL; CEBPA; CREBBP; CUX1; DNMT3A; EGLN1; EID1; EID2; EID3; EPO; EPOR; ERG; ETV6; EVI1; EZH2; FLT3; FOXPI1; GATA1; GATA2; GCSF; GDF15; GSN; HIF1A; HIF3A; HINT1; HOXA9; IDH1; IFI30; IKZF1; IL6; IL6R; IRF4; IRF8; JAK2; JUN-D; JUNB; KIF17; KRAS; L3MBTL; MPL;
Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., Beisel, C., Kralovics, R. & Skoda, R.C. (2014) Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in		

myeloproliferative neoplasms. <i>Blood</i> , 123 , 2220-2228.	Magor, G.W., Tallack, M.R., Klose, N.M., Taylor, D., Korbie, D., Mollee, P., Trau, M. & Perkins, A.C. (2016) Rapid Molecular Profiling of Myeloproliferative Neoplasms Using Targeted Exon Resequencing of 86 Genes Involved in JAK-STAT Signaling and Epigenetic Regulation. <i>Journal of Molecular Diagnostics</i> , 18 , 707-718.	8 triple negative ET patients	MYB; MYBL1; MYBL2; MYC; MYCBP; NF1; NFE2; NPM1; NRAS; p300; PAS1; PIAS1; PIAS2; PIAS3; PIAS4; PIK3AP1; PIK3C2A; PIK3C2B; PIK3C2G; PIK3C3; PIK3CA; PIK3CB; PIK3CD; PIK3CG; PIK3IP1; PIK3R1; PIK3R2; PIK3R3; PIK3R4; PIK3R5; PIK3R6; PRMT5; PTEN; PTPN11; PTPRT; RBBP5; SCF; SGK2; SH2B3; SOCS1; SOCS3; SOSC2; STAT3; STAT5; TET2; TNR; TP53; TPO; VHL; WT1; ZFP36L1.CALR was analyzed by allele-specific PCR. Targeted NGS for all coding exons of 86 genes (no information about coverage of each gene): AIFM2; AKT1; APC; ASXL1; BARD1; BCL2L1; BCL2L11; CALR; CBL; CDC25A; CDC42; CHEK2; CSF3R; DAP3; DNMT3A; DUSP1; EED; EPOR; ETV6; EZH2; FAT4; FLT3; FOXO3; GATA1; GRB2; IDH1; IDH2; IKZF1; INPP5D JAK1; JAK2; JAK3; JARID2; JUNB; KIT; KLF1; KLF3; MAP2K3; MAP3K5 MAPK1; MAPK14; MIR662; MPL; MYB; NFE2; NRAS; OSM; PDGFRA; PDGFRB; PIK3CA; PIK3CB; PIK3CD; PIK3CG; PIK3R1; PIK3R2; POLG; PTPN11; PTPN6; PTPRC; RAC2; RAF1; RASA1; RASA2; RBBP4; RBBP7; RECQL4; SCRIB; SETBP1; SF3B1; SH2B3; SOCS1; SOCS3; SPRY1; SRSF2; STAT1; STAT3; STAT5A; STAT5B; SUZ12; TCF12; TET2; TMEM115; TYK2; U2AF1; XRCC4; ZFHX3.
Milosevic Feenstra, J.D., Nivarthi, H., Gisslinger, H., Leroy, E., Rumi, E., Chachoua, I., Bagnieski, K., Kubesova, B., Pietra, D., Gisslinger, B., Milanesi, C., Jäger, R., Chen, D., Berg, T., Schalling, M., Schuster, M., Bock, C., Constantinescu, S.N., Cazzola, M. & Kralovics, R. (2016) Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. <i>Blood</i> , 127 , 325-332.	4 triple negative ET for WES and 53 triple negative ET patients for Sanger sequencing.	WES and Sanger Sequencing of all coding exons in MPL	
Paz, D.L., Mansier, O., Riou, J., Conejero, C., Roy, L., Belkhodja, C., Ugo, V. & Giraudier, S. (2019) Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: A single center prospective cohort experience. <i>Haematologica</i> , 104 , e134-e137.	43 triple negative ET patients	Targeted NGS for 16 genes: ASXL1, EZH2, DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2, TP53, SF3B1, SRSF2, CBL, NRAS, KRAS, JAK2, MPL, SH2B3, IKZF1. All exons from JAK2 and MPL were sequenced.	
Tefferi, A., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Finke, C.M., Rotunno, G., Elala, Y., Pacilli, A., Hanson, C.A., Pancrazzi, A., Ketterling, R.P., Mannarelli,	4 triple negative ET patients	Targeted NGS of hotspot regions of 27 genes: ET2, DNMT3A, IDH1, IDH2, ASXL1, EZH2, SUZ12, SRSF2, SF3B1, ZRSR2, U2AF1, PTPN11, TP53, SH2B3,	

C., Barraco, D., Fanelli, T., Pardanani, A., Gan- gat, N. & Vannucchi, A.M. (2016) Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. <i>Blood Advances</i> , 1 , 21-30.		RUNX1, CBL, NRAS, JAK2 (exons 12 and 14), CSF3R, FLT3, KIT, CALR (all ex- ons), MPL (exon 10), NPM1, CEBPA, IKZF1, and SETBP1.
Zaidi, U., Shahid, S., Fatima, N., Ahmed, S., Sufaida, G., Nadeem, M. & Shamsi, T. (2017) Ge- nomic profile of a patient with triple negative es- sential thrombocythemia, unresponsive to ther- apy: A case report and literature review. <i>Journal of Advanced Research</i> , 8 , 375-378.	1 triple negative ET patient	Targeted NGS 54 genes, including 15 full genes and 35 hotspots (no mention as to which genes were fully sequenced and which had only the hotspots se- quenced): ABL1, ASXL1, ATRX, BCOR, BCORL1, BRAF, CALR, CBL, CBLB, CBLC, CDKN2A, CEBPA, CSF3R, CUX1, DNMT3A, ETV6/TEL, EZH2, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, JAK2, JAK3, KDM6A, KIT, KRAS, MLL, MPL, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PHF6, PTEN, PTPN11, RAD21, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1, ZRSR2.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, elucidamos vários aspectos relacionados à dinâmica clonal das neoplasias mieloides. Caracterizamos, pela primeira vez, a dinâmica clonal pós-TACPH de uma LMA diagnosticada no cenário de mutações germinativas predisponentes; descrevemos, pela primeira vez, uma mutação no gene *NFE2* associada ao desenvolvimento de LMA sem acometimento extramedular, confirmada paralelamente por outro grupo (200). Além disso, estabelecemos dois mecanismos de progressão clonal para neoplasias mieloides em pacientes com trombocitopenia familiar relacionada ao *RUNX1*: perda do alelo funcionante e aquisição de mutações em outros genes recorrentemente mutados em neoplasias mieloides.

Ainda, não fomos capazes de identificar uma relação clonal entre células endoteliais progenitoras (ECFCs) e células progenitoras hematopoiéticas em pacientes com neoplasias mieloproliferativas com mutação *JAK2V61F*. Apesar disso, identificamos um fenótipo específico nas ECFCs isoladas de pacientes com NMP *JAK2V617F*⁺, caracterizadas por maior adesividade, com menor capacidade de migração e angiogênese em relação a ECFCs de indivíduos saudáveis.

Oferecemos uma potencial explicação para esse fenótipo distinto, envolvendo a maior expressão, nas ECFCs isoladas de pacientes com NMP *JAK2V617F*⁺, de uma metaloprotease envolvida na clivagem de proteínas de membrana celular, a ADAM17, cujas concentrações plasmáticas em portadores de NMP foi superior a de indivíduos saudáveis. Essa concentração também foi maior em indivíduos com *JAK2V617F*, na comparação com portadores de NMP sem essa mutação. Tal fato sugere um papel para mutação *JAK2V617F* no fenótipo endotelial, independente da relação clonal dessas células com as células originadoras das NMP.

Finalmente, empregando NGS em pacientes com TE TN, identificamos mutações canônicas em genes classicamente associados a NMP em 22% dos pacientes, sem identificação de mutações claramente patogênicas nos demais pacientes. A revisão sistemática das publicações relatando resultados de NGS em TE TN confirmou e ampliou a extensão dos nossos achados, identificando mutações no gene *MPL* como o principal achado do uso de NGS em TE TN.

O conjunto desses achados é bastante revelador sobre a importância da dinâmica clonal nas neoplasias mieloides, principalmente sobre o papel do NGS na caracterização dessa dinâmica.

Nos três tópicos analisados neste trabalho, nos deparamos com heterogeneidade dos painéis de sequenciamento utilizados como maior obstáculo para generalização e análise conjunta das diferentes bases de dados. Mesmo o uso de WGS muitas vezes não é capaz de identificar elementos relevantes da dinâmica clonal se não aplicado a grandes populações. O achado das mutações de *NFE2* relacionadas ao desenvolvimento de LMA é um bom exemplo desta situação.

Descritas em cerca de 2% das NMP (10) essas mutações nunca haviam sido descritas em LMA até recentemente, quando Lazarevic *et al.* documentaram sua presença em 4/6 pacientes com LMA com acometimento extramedular exclusivo (201). Esse relato se deu num contexto em que mais de 200 pacientes com LMA já haviam sido submetidos a WGS (63) e mais de 1600 já haviam sido submetidos a NGS direcionado (202). De fato, concomitante à nossa descrição, Jutzi *et al.* identificaram que a prevalência desta mutação em LMA era de 3% (200).

Fica evidente que, um retrato fiel e abrangente da dinâmica clonal em neoplasias mieloides só pode ser alcançado através do uso de técnicas de sequenciamento com ampla cobertura e profundidade, envolvendo um grande número de pacientes. O uso de ferramentas de bioinformática e estudos em modelos animal ou *in vitro* para avaliação da patogenicidade de variantes são fundamentais para equilibrar a grande sensibilidade do NGS com a baixa especificidade dos seus achados.

Nessa mesma linha, nossos achados de NGS e revisão sistemática envolvendo pacientes com TE TN reforçam a importância do uso de técnicas sensíveis e abrangentes de sequenciamento para o diagnóstico mais adequado da clonalidade. O achado de mutações canônicas em genes classicamente relacionados a NMP em 22% da nossa população TE TN reflete a mesma proporção de pacientes incluídos na nossa revisão sistemática, em que foram identificadas mutações do gene *MPL*. O fato de que 1/3 dessas mutações foram identificadas fora do éxon 10, classicamente único éxon do *MPL* analisado nos painéis de NGS, incluindo o utilizado nesse estudo, reforça a importância da questão da abrangência e profundidade desta técnica, principalmente quando utilizado em situações onde como o status TN, em que múltiplos

grupos sequenciando um grande número de pacientes, não foram capazes de detectar mutações condutoras adicionais.

Por outro lado, nossos achados de revisão sistemática dessa população ressaltam as limitações que um entendimento mais detalhado da dinâmica clonal tem em pacientes com uma doença de comportamento biológico pouco agressivo. Se uma contribuição diagnóstica do uso de NGS em TE TN é possível utilizados painéis de sequenciamento com cobertura adequada, seu impacto no prognóstico e conduta dessas pacientes é questionável e provavelmente negligenciável, do ponto de vista clínico.

Finalmente, os achados relacionados a dinâmica clonal entre células endoteliais e células hematopoiéticas, em NMP, destacam a complexa relação entre genótipo e fenótipo e as dificuldades de se avaliar o alcance dos efeitos desta dinâmica clonal em tipos celulares de difícil acesso.

Não há modelo ideal de estudo da função endotelial *in vivo* (203, 204) e os diferentes modelos empregados, como revisado anteriormente neste trabalho, partem de pressupostos muitas vezes não confirmados *in vivo*. A questão de como as células endoteliais adquirem essa mutação permanece a ser elucidada. A possibilidade de transdiferenciação de células hematopoiéticas em células endoteliais (205) ou da transferência de material genético por meio de microvesículas e/ou exossomas é bastante atraente(185), mas carece de validação formal.

Independente disto, no entanto, fomos capazes de documentar um fenótipo distinto das células endoteliais de pacientes com NMP *JAK2V617F*⁺ não relacionado a expressão dessa mutação nessas células. Este achado sugere que mutações somáticas em um determinado tipo celular ou tecido podem impactar outras células e tecidos, independente da expressão da referida mutação nestes. Um fenômeno semelhante já foi observado na relação entre hematopoiese clonal e risco cardiovascular(206). De fato, observamos uma relação entre o aumento da adesividade das células endoteliais e o aumento da concentração plasmática de ADAM17, particularmente em indivíduos *JAK2V617F* positivos. Entretanto, os mecanismos pelos quais essa relação se desenvolve ainda precisam ser elucidados. Nesse sentido, o estudo dos impactos fenotípicos da dinâmica clonal de proliferações mieloides em células e tecidos não portadores desta mutação se apresenta como uma atraente e relevante área de estudo.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, pudemos:

- a) mostrar pela primeira vez, a dinâmica clonal pós-TACPH de uma LMA diagnosticada em associação a mutações germinativas predisponentes e estabelecemos dois mecanismos de progressão clonal para neoplasias mieloides em pacientes com trombocitopenia familiar relacionada ao *RUNX1*: perda do alelo funcionante e aquisição de mutações em outros genes recorrentemente mutados em neoplasias mieloides;
- b) identificar um fenótipo específico nas ECFCs isoladas de pacientes com NMP *JAK2V617F*⁺, caracterizadas por maior adesividade, com menor capacidade de migração e angiogênese em relação a ECFCs de indivíduos saudáveis. Esse fenótipo foi observado na ausência da mutação *JAK2V617F* nessas células, achado que descarta uma relação clonal com as células hematopoiéticas, e pode estar relacionado com o aumento da ADAM17 expressa em ECFCs e em amostras de plasma de portadores de NMP em relação aos controles;
- c) identificar mutações canônicas em genes classicamente associados a NMP em 22% dos pacientes com TE TN, sem identificação de mutações claramente patogênicas nos demais pacientes. Esse achado foi corroborado e ampliado pela revisão sistemática das publicações utilizando NGS em TN TE.

Nossos achados reforçam o papel da dinâmica clonal como um elemento central da fisiopatologia das neoplasias mieloides. O uso de NGS representou uma revolução na nossa compreensão dessa dinâmica, mas limitações de escopo, profundidade e especificidade dos achados requerem o constante aprimoramento dos painéis utilizados e análises empregadas.

O entendimento mais sofisticado desta dinâmica, incluindo a caracterização de mutações mais raras, envolvidas na progressão dessas neoplasias a partir de estados assintomáticos, e do impacto de mutações somáticas de células hematopoiéticas em tipos celulares distintos pode levar a identificação de novos alvos terapêuticos, trazendo avanços significativos no tratamento e eventualmente até na prevenção destas doenças.

7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DO ALUNO DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

7.1. RELATIVA A ESTA TESE

7.1.1. ARTIGOS CIENTÍFICOS

1. **Duarte BKL**, Yamaguti-Hayakawa GG, Medina SS, Siqueira LH, Snetsinger B, Costa FF, Rauh MJ, Ozelo MC. Longitudinal sequencing of RUNX1 familial platelet disorder: new insights into genetic mechanisms of transformation to myeloid malignancies. *Br J Haematol.* 2019 Sep;186(5):724-734. doi: 10.1111/bjh.15990. Epub 2019 May 24. PMID: 31124578.
2. **Duarte BKL**, Yamaguti-Hayakawa GG, Chaves HVS, Siqueira LH, Snetsinger B, McNaughton AJM, Costa FF, Pagnano KBB, Rauh MJ, Ozelo MC. Critical appraisal of the clinical utility of NGS in triple negative essential thrombocythemia: report of 21 cases and systematic review (em submissão).
3. **Duarte BKL**, Ospina-Prieto S, Siqueira LH, Frade JO, Monteiro LOS, Soares PE, Yamaguti-Hayakawa GG, Rauh MJ, Costa FF, Ozelo MC. ADAM17 expression correlates with the increased adhesion of red blood cells to endothelial colony-forming cells lacking *JAK2V617F* in patients with myeloproliferative neoplasms (em preparação para submissão)

7.1.2. APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS E PALESTRAS EM CONGRESSOS

1. **Duarte BKL**, Ospina-Prieto S, Yamaguti-Hayakawa GGY, Saez RC, Pagnano KBB, Costa FF, Ozelo MC. Thromboembolic events in patients with bcr-abl1-negative myeloproliferative neoplasms are not related to in vitro endothelial cells adhesiveness nor JAK2-V617F expression. In: International Society of Thrombosis and Hemostasis Meeting, 2017, Berlin. Research and Practice on Thrombosis and Hemostasis, 2017. V. 1. P. 78 (Apresentação oral, travel grant “Reach the World”).
2. **Duarte BKL**, Ospina-Prieto S, Yamaguti-Hayakawa GGY, Saez RC, Pagnano KBB, Costa FF, Ozelo MC. Distinct *in vitro* functional properties of endothelial cells from myeloproliferative patients with and without a previous venous thromboembolism are not related to the JAK2-V617F expression in endothelial cells.

- In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2017, Curitiba (Apresentação oral).
3. **Duarte BKL**, Medina SS, Yamaguti-Hayakawa GGY, Costa FF, Rauh MJ, Ozelo MC. Somatic Mutations Associated with Myeloid Transformation of RUNX1-Mutated Familial Platelet Disorders with Propensity to Myeloid Malignancies Using Targeted Next-Generation Sequencing. In: American Society of Hematology Meeting, 2017, Atlanta. Blood, 2017. v. 130. p. 2482. (Apresentação de poster, travel grant)
 4. Ospina-Prieto S, **Duarte BKL**, Guanaes, JFO; Costa FF; Ozelo MC; Endothelial Colony-Forming Cells (ECFC) as an Autologous Model for Studying Endothelial Pathophysiology in Sickle Cell Anemia and Myeloproliferative Neoplasms. In: American Society of Hematology Meeting, 2018, San Diego. Blood, 2018. v. 132. p. 74. (Apresentação oral, travel grant)
 5. **Duarte BKL**, Ospina-Prieto S, Siqueira LH, Guanaes JFO, Costa FF, Ozelo MC. The Pro-Adhesive and Reduced Angiogenic Properties of Endothelial Colony Forming Cells (ECFC) from JAK2V617F MPN Patients Are Not Related to the Expression of the JAK2 mutation in These Cells: A Potential Role of ADAM17. In: American Society of Hematology Meeting, 2019, Orlando. Blood, 2019. v. 134. p. 3618. (Apresentação de poster, travel grant)
 6. “Trombose em neoplasias mieloproliferativas”. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO2017, Curitiba, PR, 11 de novembro de 2017 (palestrante convidado)

7.2. GERAL

7.2.1. ARTIGOS CIENTÍFICOS

1. Lima AS, de Mello MR, Fernandes E, Bezerra MF, Oliveira MM, **Duarte BK**, de Assis RA, Souto FR, Ramos CF, Machado CG, Pagnano K, Lucena-Araujo AR, Lorand-Metze I, Bezerra MA. Clinical outcomes of patients with acute myeloid leukemia: evaluation of genetic and molecular findings in a real-life setting. Blood. 2015 Oct 8;126(15):1863-5. doi: 10.1182/blood-2015-07-657551. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26320101
2. **Duarte BKL**, de Souza SM, Costa-Lima C, Medina SS, Ozelo MC. Thalidomide for the Treatment of Gastrointestinal Bleeding Due to Angiodysplasia in a

- Patient with Glanzmann's Thrombasthenia. *Hematol Rep.* 2017 Jun 15;9(2):6961. doi: 10.4081/hr.2017.6961. PMID: 28670433; PMCID: PMC5477473.
3. Braga CCB, Benites BD, de Albuquerque DM, Alvarez MC, Seva-Pereira T, **Duarte BKL**, Costa FF, Gilli SCO, Saad STO. Deferasirox associated with liver failure and death in a sickle cell anemia patient homozygous for the -1774delG polymorphism in the *Abcc2* gene. *Clin Case Rep.* 2017 Jun 15;5(8):1218-1221. doi: 10.1002/ccr3.1040. PMID: 28781827; PMCID: PMC5538070.
 4. Medina SS, Siqueira LH, Colella MP, Yamaguti-Hayakawa GG, **Duarte BKL**, Dos Santos Vilela MM, Ozelo MC. Intermittent low platelet counts hampering diagnosis of X-linked thrombocytopenia in children: report of two unrelated cases and a novel mutation in the gene coding for the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *BMC Pediatr.* 2017 Jun 22;17(1):151. doi: 10.1186/s12887-017-0897-6. PMID: 28641574; PMCID: PMC5480256.
 5. Bezerra MF, Lima AS, Piqué-Borràs MR, Silveira DR, Coelho-Silva JL, Pereira-Martins DA, Weinhäuser I, Franca Neto PL, Quek L, Corby A, Oliveira MM, Lima M, de Assis RA, De Melo Campos P, **Duarte BKL**, Bendit I, Rocha V, Rego EM, Traina F, Olalla Saad S, Beltrao E, Bezerra M, Lucena-Araujo AR. Co-occurrence of DNMT3A, NPM1, FLT3 mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis. *Blood.* 2020 Jan 23;blood.2019003339. doi: 10.1182/blood.2019003339. [Epub ahead of print]. PMID: 31977039.

7.2.2. APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS E PALESTRAS EM CONGRESSOS

1. **Duarte BKL**, Colella MP, Souza FVP, Hayakawa GGY, Marques Jr, JFC; Vigorito AC, Paula EV, Ozello MC. Vinorelbine-Based Hematopoietic Stem-Cell Mobilization: A More Effective, Low-Cost Alternative to Conventional Chemotherapy. In: American Society of Hematology Meeting, 2017, San Diego. *Blood*, 2017. v. 132. p. 4762.
2. **Duarte BKL**, Hayakawa GGY, Ferreira FA, Pagnano KBB, Paula EV, Ozello MC. A Simple Bundle To Control An Outbreak Of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae In An Onco-Hematological Inpatient Unit: Report From A Single Center. In: American Society of Hematology Meeting, 2017, Atlanta. *Blood*, 2017. v. 130. p. 4651.

3. Bachur LF, **Duarte BKL**, Fagnani R, Hofling CC, Cardoso LGO, Rezende MR, Moretti ML, Paula EV, Ozelo MC, Trabasso P. Use of voriconazole for invasive fungal infection outbreak control: report of a single-centre intervention. In: European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2018, Madrid. ECCMID 2018, 2018. v. P0307.
4. Del Rio APT, Ospina-Prieto S, **Duarte BKL**, Bertolo MB, Ozelo MC, Sachetto Z. Evaluation Of The Functional Activity Of Endothelial Progenitor Cells In Patients With ANCA-Associated Vasculitis. In: American College of Rheumatology Meeting Abstracts, 2018, Chicago. *Arthritis Rheumatol.* 2018, 70 (suppl 10), p. 1761.

8. REFERÊNCIAS

1. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2168-81.
2. Huang X, Cortes J, Kantarjian H. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*. 2012;118(12):3123-7.
3. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American journal of hematology*. 2018;93(3):442-59.
4. Emerson G, Kaide CG. Rapid Fire: Acute Blast Crisis/Hyperviscosity Syndrome. *Emerg Med Clin North Am*. 2018;36(3):603-8.
5. Mandanas RA, Leibowitz DS, Gharehbaghi K, Tauchi T, Burgess GS, Miyazawa K, et al. Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood*. 1993;82(6):1838-47.
6. Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell*. 1992;70(6):901-10.
7. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 1996;13(2):247-54.
8. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2016;91(2):252-65.
9. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(10):917-27.
10. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2018;379(15):1416-30.
11. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundle G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391-405.
12. Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood*. 2017;130(23):2475-83.
13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.

14. Spivak JL. How I treat polycythemia vera. *Blood*. 2019;134(4):341-52.
15. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood cancer journal*. 2018;8(2):15-.
16. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013;88(6):507-16.
17. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005;23(10):2224-32.
18. Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, Kiladjian JJ, Janssen HL, Leebeek FW. Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood*. 2012;120(25):4921-8.
19. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:571-81.
20. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia*. 2018;32(5):1057-69.
21. Masarova L, Patel KP, Newberry KJ, Cortes J, Borthakur G, Konopleva M, et al. Pegylated interferon alfa-2a in patients with essential thrombocythaemia or polycythaemia vera: a post-hoc, median 83 month follow-up of an open-label, phase 2 trial. *The Lancet Haematology*. 2017;4(4):e165-e75.
22. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *New Engl J Medicine*. 2015;372(5):426-35.
23. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O'Rorke M, Mesa R, De Vocht F, et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol*. 2014;89(6):581-7.
24. Campbell PJ, MacLean C, Beer PA, Buck G, Wheatley K, Kiladjian JJ, et al. Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocythemia: analysis of the prospective PT1 cohort. *Blood*. 2012;120(7):1409-11.

25. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011;117(22):5857-9.
26. Hultcrantz M, Kristinsson SY, Andersson TM-L, Landgren O, Eloranta S, Derolf ÅR, et al. Patterns of Survival Among Patients With Myeloproliferative Neoplasms Diagnosed in Sweden From 1973 to 2008: A Population-Based Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(24):2995-3001.
27. Harrison CN, Mead AJ, Panchal A, Fox S, Yap C, Gbandi E, et al. Ruxolitinib vs best available therapy for ET intolerant or resistant to hydroxycarbamide. *Blood*. 2017;130(17):1889-97.
28. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(6):761-70.
29. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120(26):5128-33; quiz 252.
30. Barbui T, Vannucchi AM, Buxhofer-Ausch V, Stefano VD, Betti S, Rambaldi A, et al. Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. *Blood Cancer Journal*. 2015;5(11):e369 e.
31. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014;89(9):915-25.
32. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*. 2011;29(23):3179-84.
33. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113(13):2895-901.

34. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood*. 2010;115(4):778-82.
35. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(17):2635-42.
36. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American journal of hematology*. 2018;93(12):1551-60.
37. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(9):799-807.
38. Tefferi A, Guglielmelli P, Pardanani A, Vannucchi AM. Myelofibrosis Treatment Algorithm 2018. *Blood cancer journal*. 2018;8(8):72-.
39. Finazzi G, Vannucchi AM, Barbui T. Prefibrotic myelofibrosis: treatment algorithm 2018. *Blood cancer journal*. 2018;8(11):104-.
40. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010;115(9):1703-8.
41. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(4):392-7.
42. Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*. 2014;383(9936):2239-52.
43. Mufti GJ, McLornan DP, van de Loosdrecht AA, Germing U, Hasserjian RP. Diagnostic algorithm for lower-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2018;32(8):1679-96.
44. Weinberg OK, Hasserjian RP. The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes(). *Semin Hematol*. 2019;56(1):15-21.
45. Hebbard M, Brouillard M, Wattel E, Decoux M, Hatron P, Devulder B, et al. Association of myelodysplastic syndrome and relapsing polychondritis: further evidence. *Leukemia*. 1995;9(4):731-3.

46. Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica*. 2009;94(2):264-8.
47. Font P, Loscertales J, Benavente C, Bermejo A, Callejas M, Garcia-Alonso L, et al. Inter-observer variance with the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) following the 2008 WHO classification. *Annals of hematology*. 2013;92(1):19-24.
48. Steensma DP. How I use molecular genetic tests to evaluate patients who have or may have myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2018;132(16):1657-63.
49. Voso MT, Fenu S, Latagliata R, Buccisano F, Piciocchi A, Aloe-Spiriti MA, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(21):2671-7.
50. Fenaux P, Santini V, Spiriti MAA, Giagounidis A, Schlag R, Radinoff A, et al. A phase 3 randomized, placebo-controlled study assessing the efficacy and safety of epoetin- α in anemic patients with low-risk MDS. *Leukemia*. 2018;32(12):2648-58.
51. Angelucci E, Li J, Greenberg PL, Depei W, Hou M, Montaña Figueroa E, et al. Safety and Efficacy, Including Event-Free Survival, of Deferasirox Versus Placebo in Iron-Overloaded Patients with Low- and Int-1-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS): Outcomes from the Randomized, Double-Blind Telesio Study. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):234-.
52. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *New Engl J Medicine*. 2006;355(14):1456-65.
53. Fenaux P, Platzbecker U, Mufti GJ, Garcia-Manero G, Buckstein R, Santini V, et al. Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(2):140-51.
54. Platzbecker U. Treatment of MDS. *Blood*. 2019;133(10):1096-107.
55. de Witte T, Bowen D, Robin M, Malcovati L, Niederwieser D, Yakoub-Agha I, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(13):1753-62.

56. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009;10(3):223-32.
57. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.
58. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5-29.
59. Röllig C, Ehninger G. How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;125(21):3246-52.
60. Almond LM, Charalampakis M, Ford SJ, Gourevitch D, Desai A. Myeloid Sarcoma: Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2017;17(5):263-7.
61. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e441.
62. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079-89.
63. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
64. Papaemmanuil E, Döhner H, Campbell PJ. Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia. *New Engl J Medicine*. 2016;375(9):900-1.
65. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
66. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, et al. Long-Term Prognosis of Acute Myeloid Leukemia According to the New Genetic Risk Classification of the European LeukemiaNet Recommendations: Evaluation of the Proposed Reporting System. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(20):2758-65.
67. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.

68. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1994;331(14):896-903.
69. Podoltsev NA, Stahl M, Zeidan AM, Gore SD. Selecting initial treatment of acute myeloid leukaemia in older adults. *Blood reviews*. 2017;31(2):43-62.
70. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 2015;126(3):291-9.
71. DiNardo CD, Perl AE. Advances in patient care through increasingly individualized therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(2):73-4.
72. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *New Engl J Medicine*. 2017;377(5):454-64.
73. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):1275-91.
74. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(5):422-33.
75. Balsat M, Renneville A, Thomas X, de Botton S, Caillot D, Marceau A, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(2):185-93.
76. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-8.
77. Jan M, Majeti R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*. 2013;32(2):135-40.
78. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333-51.
79. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.

80. Kircher M, Kelso J. High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *BioEssays*. 2010;32(6):524-36.
81. Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*. 2011;470(7333):198-203.
82. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*. 2005;15(12):1767-76.
83. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(1):31-46.
84. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348-52.
85. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364-.
86. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*. 2015;526(7571):75-81.
87. Atlas TCG. Outcomes & Impact of The Cancer Genome Atlas 2019 [updated March 6th, 2019. Available from: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga/history>.
88. Li FP, Fraumeni JF, Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*. 1969;71(4):747-52.
89. Godley LA, Shimamura A. Genetic predisposition to hematologic malignancies: management and surveillance. *Blood*. 2017;130(4):424-32.
90. Wartiovaara-Kautto U, Hirvonen EAM, Pitkanen E, Heckman C, Saarela J, Kettunen K, et al. Germline alterations in a consecutive series of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018;32(10):2282-5.
91. Sud A, Chattopadhyay S, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist J, Houlston RS, et al. Familial risks of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2018;132(9):973-6.
92. Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi KL, Shao J, Koboldt D, Miller CA, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(22):2484-90.

93. Borate U, Yang F, Press RD, Pavlick D, Juckett L, Agarwal A, et al. Prevalence of Inherited Cancer Predisposition Mutations in a Cohort of Older AML Patients Enrolled on the Beat AML Master Trial. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):373-.
94. Guidugli L, Johnson AK, Alkorta-Aranburu G, Nelakuditi V, Arndt K, Churpek JE, et al. Clinical utility of gene panel-based testing for hereditary myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes. *Leukemia*. 2017;31(5):1226-9.
95. Imperato MR, Cauchy P, Obier N, Bonifer C. The RUNX1–PU.1 axis in the control of hematopoiesis. *International Journal of Hematology*. 2015;101(4):319-29.
96. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, Grossmann V, Schindela S, Dicker F, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014;28(1):129-37.
97. Ogawa S. Genetics of MDS. *Blood*. 2019;133(10):1049-59.
98. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*. 1999;23(2):166-75.
99. Luo X, Feurstein S, Mohan S, Porter CC, Jackson SA, Keel S, et al. ClinGen Myeloid Malignancy Variant Curation Expert Panel recommendations for germline RUNX1 variants. *Blood advances*. 2019;3(20):2962-79.
100. Noris P, Biino G, Pecci A, Civaschi E, Savoia A, Seri M, et al. Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders. *Blood*. 2014;124(6):e4-e10.
101. Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, Balayn N, Gilles L, Rameau P, et al. Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood*. 2012;120(13):2708-18.
102. Kanagal-Shamanna R, Loghavi S, DiNardo CD, Medeiros LJ, Garcia-Manero G, Jabbour E, et al. Bone marrow pathologic abnormalities in familial platelet disorder with propensity for myeloid malignancy and germline RUNX1 mutation. *Haematologica*. 2017;102(10):1661-70.
103. Cavalcante de Andrade Silva M, Krepischi ACV, Kulikowski LD, Zanardo EA, Nardinelli L, Leal AM, et al. Deletion of RUNX1 exons 1 and 2 associated with familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics*. 2018;222-223:32-7.

104. Latger-Cannard V, Philippe C, Bouquet A, Baccini V, Alessi M-C, Ankri A, et al. Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet journal of rare diseases*. 2016;11(1):49.
105. Antony-Debre I, Duployez N, Bucci M, Geffroy S, Micol JB, Renneville A, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(4):999-1002.
106. Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, et al. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nat Commun*. 2014;5:4770.
107. Mill CP, Fiskus W, DiNardo CD, Qian Y, Raina K, Rajapakshe K, et al. RUNX1-targeted therapy for AML expressing somatic or germline mutation in RUNX1. *Blood*. 2019;134(1):59-73.
108. Hamilton KV, Maese L, Marron JM, Pulsipher MA, Porter CC, Nichols KE. Stopping Leukemia in Its Tracks: Should Preemptive Hematopoietic Stem-Cell Transplantation be Offered to Patients at Increased Genetic Risk for Acute Myeloid Leukemia? *J Clin Oncol*. 2019;37(24):2098-104.
109. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*. 2013;27(9):1874-81.
110. Montanaro M, Latagliata R, Cedrone M, Spadea A, Rago A, Di Giandomenico J, et al. Thrombosis and survival in essential thrombocythemia: a regional study of 1,144 patients. *American journal of hematology*. 2014;89(5):542-6.
111. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet*. 1978;2(8102):1219-22.
112. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *New Engl J Medicine*. 2013;368(1):22-33.
113. Barbui T, Masciulli A, Marfisi MR, Tognoni G, Finazzi G, Rambaldi A, et al. White blood cell counts and thrombosis in polycythemia vera: a subanalysis of the CYTO-PV study. *Blood*. 2015;126(4):560-1.

114. Carobbio A, Ferrari A, Masciulli A, Ghirardi A, Barosi G, Barbui T. Leukocytosis and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: a systematic review and meta-analysis. *Blood advances*. 2019;3(11):1729-37.
115. Finazzi MC, Carobbio A, Cervantes F, Isola IM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. CALR mutation, MPL mutation and triple negativity identify patients with the lowest vascular risk in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2015;29(5):1209-10.
116. Falchi L, Kantarjian HM, Verstovsek S. Assessing the thrombotic risk of patients with essential thrombocythemia in the genomic era. *Leukemia*. 2017;31(9):1845-54.
117. Barbui T, Falanga A. Molecular biomarkers of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res*. 2016;140 Suppl 1:S71-5.
118. Wautier M-P, El Nemer W, Gane P, Rain J-D, Cartron J-P, Colin Y, et al. Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin alpha5 chain and Lu/BCAM. *Blood*. 2007;110(3):894-901.
119. De Grandis M, Cambot M, Wautier M-P, Cassinat B, Chomienne C, Colin Y, et al. JAK2V617F activates Lu/BCAM-mediated red cell adhesion in polycythemia vera through an EpoR-independent Rap1/Akt pathway. *Blood*. 2013;121(4):658-65.
120. Neunteufl T, Heher S, Stefenelli T, Pabinger I, Gisslinger H. Endothelial dysfunction in patients with polycythaemia vera. *British journal of haematology*. 2001;115(2):354-9.
121. Yildiz A, Gryildirim M, Pepeler MS, Yazol M, Oktar S, Acar K. Assessment of Endothelial Dysfunction With Flow-Mediated Dilatation in Myeloproliferative Disorders. *Clin Appl Thrombosis Hemostasis*. 2018;24(7):1102-8.
122. Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2014;229(1):10-6.
123. Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le Lay N, Peghaire C, Kilani B, Dias JV, et al. Vascular endothelial cell expression of JAK2(V617F) is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. *Haematologica*. 2019;104(1):70-81.
124. Etheridge SL, Michelle ER, Megan EC, Veena S, Norma EF, Junmei C, et al. JAK2V 617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(6):2295-300.

125. Guadall A, Lesteven E, Letort G, Awan Toor S, Delord M, Pognant D, et al. Endothelial Cells Harboring the JAK2V617F Mutation Display Pro-Adherent and Pro-Thrombotic Features. *Thrombosis and haemostasis*. 2018;118(9):1586-99.
126. Teofili L, Larocca LM. Blood and endothelial cells: together through thick and thin. *Blood*. 2013;121(2):248-9.
127. Bautch VL. Stem cells and the vasculature. *Nature medicine*. 2011;17(11):1437-43.
128. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109(5):1801-9.
129. Asahara T. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964 6.
130. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(1):71-7.
131. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9):2752-60.
132. Piaggio G, Rosti V, Corselli M, Bertolotti F, Bergamaschi G, Pozzi S, et al. Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. *Blood*. 2009;114(14):3127-30.
133. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem cells translational medicine*. 2017;6(5):1316-20.
134. Smadja DM, Melero-Martin JM, Eikenboom J, Bowman M, Sabatier F, Randi AM. Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *J Thromb Haemost*. 2019;17(7):1190-4.
135. Teofili L, Martini M, Iachininoto MG, Capodimonti S, Nuzzolo ER, Torti L, et al. Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2(V617F) mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;117(9):2700-7.

136. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*. 2007;21(6):1141-9.
137. Rosti V, Villani L, Riboni R, Poletto V, Bonetti E, Tozzi L, et al. Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2V617F mutation. *Blood*. 2013;121(2):360-8.
138. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood*. 2009;113(21):5246-9.
139. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med*. 1976;295(17):913-6.
140. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-97.
141. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
142. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(25):2379-90.
143. Schieber M, Crispino JD, Stein B. Myelofibrosis in 2019: moving beyond JAK2 inhibition. *Blood Cancer Journal*. 2019;9(9):74.
144. How J, Hobbs GS, Mullally A. Mutant calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2019;134(25):2242-8.
145. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-7.
146. Monte-Mor BdCR, Ayres-Silva JdP, Correia WD, Coelho AC, Solza C, Dumas AH, et al. Clinical features of JAK2V617F- or CALR-mutated essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2016;60:74-7.
147. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-9.

148. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018;32(7):1631-42.
149. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(4):310-8.
150. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Gangat N, Ketterling RP, Pardanani A, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(17):1769-70.
151. Asp J, Andréasson B, Hansson U, Wasslavik C, Abellsson J, Johansson P, et al. Mutation status of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis defines clinical outcome. *Haematologica*. 2016;101(4):e129-e32.
152. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Advances*. 2016;1(1):21-30.
153. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127(3):333-42.
154. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(3):325-32.
155. Delic S, Rose D, Kern W, Nadarajah N, Haferlach C, Haferlach T, et al. Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*. 2016;175(3):419-26.
156. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11(4):361-2.
157. Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(W1):W452-W7.

158. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
159. Sakamoto TM, Lanaro C, Ozelo MC, Garrido VT, Olalla-Saad ST, Conran N, et al. Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. *Microvascular research*. 2013;90:173-9.
160. Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad STO, Costa FF, et al. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. *European journal of haematology*. 2007;78(2):144-51.
161. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007;2(2):329-33.
162. Ferratge S, Boyer J, Arouch N, Chevalier F, Uzan G. Circulating endothelial progenitors in vascular repair. *Bio-medical materials and engineering*. 2017;28(s1):S65 S74.
163. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PG. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLOS Medicine*. 2009;6(7):e1000097.
164. Zhan H, Lin CHS, Segal Y, Kaushansky K. The JAK2V617F-bearing vascular niche promotes clonal expansion in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2017;32(2):462-9.
165. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109(5):1801-9.
166. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
167. Didone A, Nardinelli L, Marchiani M, Ruiz ARL, de Lima Costa AL, Lima IS, et al. Comparative study of different methodologies to detect the JAK2 V617F mutation in chronic BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. *Pract Lab Med*. 2015;4:30-7.

168. Sekeres MA, Othus M, List AF, Odenike O, Stone RM, Gore SD, et al. Randomized Phase II Study of Azacitidine Alone or in Combination With Lenalidomide or With Vorinostat in Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia: North American Intergroup Study SWOG S1117. *J Clin Oncol Official J Am Soc Clin Oncol*. 2017;35(24):2745-53.
169. Ferratge S, Ha G, Carpentier G, Arouche N, Bascetin R, Muller L, et al. Initial clonogenic potential of human endothelial progenitor cells is predictive of their further properties and establishes a functional hierarchy related to immaturity. *Stem Cell Res*. 2017;21:148-59.
170. Maino A, Siegerink B, Lotta LA, Crawley JTB, le Cessie S, Leebeek FWG, et al. Plasma ADAMTS-13 levels and the risk of myocardial infarction: an individual patient data meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(8):1396-404.
171. Andersson HM, Siegerink B, Luken BM, Crawley JTB, Algra A, Lane DA, et al. High VWF, low ADAMTS13, and oral contraceptives increase the risk of ischemic stroke and myocardial infarction in young women. *Blood*. 2012;119(6):1555-60.
172. Helman R, Pereira WdO, Marti LC, Campregher PV, Puga RD, Hamerschlak N, et al. Granulocyte whole exome sequencing and endothelial JAK2V617F in patients with JAK2V617F positive Budd-Chiari Syndrome without myeloproliferative neoplasm. *British journal of haematology*. 2018;180(3):443-5.
173. Hebbel RP. Blood endothelial cells: utility from ambiguity. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(5):1613-5.
174. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood*. 2017;130(16):1795-9.
175. Dragoni S, Reforgiato M, Zuccolo E, Poletto V, Lodola F, Ruffinatti FA, et al. Dysregulation of VEGF-induced proangiogenic Ca²⁺ oscillations in primary myelofibrosis-derived endothelial colony-forming cells. *Experimental hematology*. 2015;43(12):1019-30.e3.
176. Grötzinger J, Lorenzen I, Düsterhöft S. Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(11 Pt B):2088-95.
177. Tsakadze NL, Sithu SD, Sen U, English WR, Murphy G, D'Souza SE. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain

cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(6):3157-64.

178. Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, et al. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(39):37459-64.

179. Moss ML, Minond D. Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target for Cancer and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:9673537-.

180. Chemaly M, McGilligan V, Gibson M, Clauss M, Watterson S, Alexander HD, et al. Role of tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) and associated proteins in coronary artery disease and cardiac events. *Arch Cardiovasc Dis*. 2017;110(12):700-11.

181. Lambrecht BN, Vanderkerken M, Hammad H. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nature reviews Immunology*. 2018;18(12):745-58.

182. Jin Y, Liu Y, Lin Q, Li J, Druso JE, Antonyak MA, et al. Deletion of Cdc42 enhances ADAM17-mediated vascular endothelial growth factor receptor 2 shedding and impairs vascular endothelial cell survival and vasculogenesis. *Mol Cell Biol*. 2013;33(21):4181-97.

183. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011;43(10):745-56.

184. Campanelli R, Massa M, Villani L, Catarsi P, Abbà C, Dejana E, et al. RUNX1 Expression Characterizes the Endothelial Cells from the Spleen and Bone Marrow of Patients with Primary Myelofibrosis. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):5486-.

185. Ramos TL, Sánchez-Abarca LI, López-Ruano G, Muntión S, Preciado S, Hernández-Ruano M, et al. Do endothelial cells belong to the primitive stem leukemic clone in CML? Role of extracellular vesicles. *Leukemia research*. 2015;39(8):921-4.

186. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-9.

187. Paz DL, Mansier O, Riou J, Conejero C, Roy L, Belkhodja C, et al. Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: A single center prospective cohort experience. *Haematologica*. 2019;104(4):e134-e7.

188. Ayalew T, Terra LL, Paola G, Christy MF, Giada R, Yoseph E, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv.* 2016;1(1):21-30.
189. Sekeres MA, Othus M, List AF, Odenike O, Stone RM, Gore SD, et al. Randomized Phase II Study of Azacitidine Alone or in Combination With Lenalidomide or With Vorinostat in Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia: North American Intergroup Study SWOG S1117. *J Clin Oncol.* 2017;JCO2015662510.
190. Acha P, Xandri M, Fuster-Tormo F, Palomo L, Xicoy B, Cabezon M, et al. Diagnostic and prognostic contribution of targeted NGS in patients with triple-negative myeloproliferative neoplasms. *American Journal of Hematology.* 2019;94(10):E264-E7.
191. Angona A, Fernández-Rodríguez C, Alvarez-Larrán A, Camacho L, Longarón R, Torres E, et al. Molecular characterisation of triple negative essential thrombocythaemia patients by platelet analysis and targeted sequencing. *Blood cancer journal.* 2016;6(8):e463.
192. Beucher A, Dib M, Orvain C, Bouvier A, Jouanneau-Courville R, Dobo I, et al. Next generation sequencing redefines a triple negative essential thrombocythaemia as double-positive with rare mutations on JAK2 V617 and MPL W515 hotspots. *British Journal of Haematology.* 2019;186(5):785-8.
193. Boiocchi L, Hasserjian RP, Pozdnyakova O, Wong WJ, Lennerz JK, Le LP, et al. Clinicopathological and molecular features of SF3B1-mutated myeloproliferative neoplasms. *Human Pathology.* 2019;86:1-11.
194. Chang YC, Lin HC, Chiang YH, Chen CGS, Huang L, Wang WT, et al. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Medical Oncology.* 2017;34(5).
195. Guo B, Allcock RJ, Mirzai B, Malherbe JA, Choudry FA, Frontini M, et al. Megakaryocytes in Myeloproliferative Neoplasms Have Unique Somatic Mutations. *American Journal of Pathology.* 2017;187(7):1512-22.
196. Ju M, Fu R, Li H, Liu X, Xue F, Chen Y, et al. Mutation profiling by targeted sequencing of “triple-negative” essential thrombocythaemia patients. *British Journal of Haematology.* 2018;181(6):857-60.

197. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220-8.
198. Magor GW, Tallack MR, Klose NM, Taylor D, Korbie D, Mollee P, et al. Rapid Molecular Profiling of Myeloproliferative Neoplasms Using Targeted Exon Resequencing of 86 Genes Involved in JAK-STAT Signaling and Epigenetic Regulation. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2016;18(5):707-18.
199. Zaidi U, Shahid S, Fatima N, Ahmed S, Sufaida G, Nadeem M, et al. Genomic profile of a patient with triple negative essential thrombocythemia, unresponsive to therapy: A case report and literature review. *Journal of Advanced Research*. 2017;8(4):375-8.
200. Jutzi JS, Basu T, Pellmann M, Kaiser S, Steinemann D, Sanders MA, et al. Altered NFE2 activity predisposes to leukemic transformation and myelosarcoma with AML-specific aberrations. *Blood*. 2019;133(16):1766-77.
201. Lazarevic V, Orsmark-Pietras C, Lilljebjörn H, Pettersson L, Rissler M, Lübking A, et al. Isolated myelosarcoma is characterized by recurrent NFE2 mutations and concurrent preleukemic clones in the bone marrow. *Blood*. 2018;131(5):577-81.
202. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
203. Wen VW, MacKenzie KL. Modeling human endothelial cell transformation in vascular neoplasias. *Dis Model Mech*. 2013;6(5):1066-79.
204. Payne S, De Val S, Neal A. Endothelial-Specific Cre Mouse Models. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology*. 2018;38(11):2550-61.
205. Villani L, Campanelli R, Gaudioso G, Poletto V, Bonetti E, Catarsi P, et al. V617FJAK2-Positive Endothelial Cells Are Present in Bone Marrow Neovessels of Patients with Myelofibrosis and Could Derive from the Transdifferentiation of Mutated Hematopoietic Cells. *Blood*. 2015;126(23):2833-.
206. Cook EK, Luo M, Rauh MJ. Clonal hematopoiesis and inflammation: partners in leukemogenesis and comorbidity. *Experimental hematology*.

9. ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação dos mecanismos envolvidos nas interações celulares estáticas e em fluxo das células endoteliais progenitoras circulantes (Blood Outgrowth Endothelial Cells, BOECs) de pacientes neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas

Pesquisador: Bruno Kosa Lino Duarte

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 37293614.0.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.085.839

Apresentação do Projeto:

Parecer de solicitação de apreciação da EMENDA 2.

Justificativa da Emenda:

Incluir no projeto de pesquisa e no TCLE o procedimento de extração de DNA de blocos de parafina das biópsias de medula óssea dos sujeitos da pesquisa, previamente colhida como parte da avaliação diagnóstica dos mesmos.

Objetivo da Pesquisa:

Nada é alterado do projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

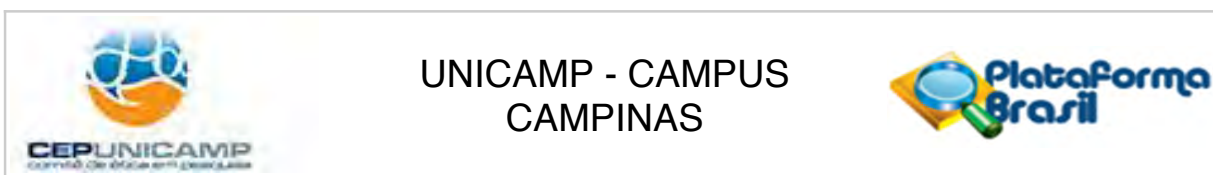
Nada é alterado do projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tamanho amostral elevado de 50 para 80 participantes (Emenda1).

No projeto completo pesquisador esclarece:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.085.839

"Em casos onde não houver disponibilidade de leucócitos para DNA, o mesmo será extraído a partir de blocos de parafina da biópsia de medula óssea desses pacientes, colhida previamente para fins de diagnóstico. A extração de DNA destas será feita segundo técnica descrita por Talaulikar e colaboradores (Talaulikar et al., 2008). Basicamente, após a desparafinização do bloco com xilol e reidratação com etanol, as amostras serão submetidas a digestão com proteinase K, procedendo-se após, a extração do DNA com fenol-clorofórmio. O DNA extraído será submetido a sequenciamento como descrito acima."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para apreciação da emenda foram anexados:

- TCLE com destaque as informações adicionadas nesta emenda
- projeto completo com destaque nas informações da emenda
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_912731_E2.pdf 02/05/2017 com justificativa da emenda

Recomendações:

Relatórios devem ser enviados ao CEP como notificação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A seguir são comentadas as pendências do parecer anterior.

1- Pendência

Na frase no TCLE "Em alguns casos, também poderemos extrair DNA da biópsia de medula óssea que você já colheu como parte da sua avaliação inicial." Não fica claro se a extração de DNA de medula óssea é para caso de necessidade ou se farão de todos os participantes, como um objetivo secundário. Esclarecer e adequar (inclusive como adição de objetivo secundário se este for o caso).

RESPOSTA: pesquisador esclarece no TCLE e carta resposta (TCLE_BOEC_vers4_com_destaque. pdf 14/05/2017/ Carta_ao_CEP_emenda_2_vers2.pdf) que :

"Com o objetivo de complementar a extração do DNA de leucócitos dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas, pacientes cujo DNA extraído a partir de leucócitos do sangue periférico não for de qualidade suficiente para análise, terão DNA extraído de blocos de parafina de suas biópsias de medula óssea, previamente colhido como parte da avaliação inicial desses pacientes."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.085.839

2- Pendência Conforme parecer de aprovação do projeto em outubro de 2014: "Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo." Assim sendo, favor apresentar relatório parcial do estudo, em formulário próprio do CEP.

RESPOSTA: Relatório parcial adequado.

-Estudo em andamento com Previsão de conclusão: 31/12/2017

-Número de participantes previsto (mencionado) na Folha de Rosto/CONEP: 50

-Numero de participantes incluídos: 15

- Não houve intercorrência com o participante, segundo a Resolução CNS/MS 466/12 e suas complementares?

- Os resultados preliminares foram aprovados para apresentação no Congresso da International Society of Thrombosis and Hemostasis, que será realizado entre 07 e 13 de julho de 2017, em Berlim Alemanha.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Todas as pendências foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do TCLE, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido e enviar notificação ao CEP junto com 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.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.085.839

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_912731E2.pdf	14/05/2017 17:33:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_BOEC_vers4_sem_destaque.pdf	14/05/2017 17:31:54	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_emenda_2_vers2.pdf	14/05/2017 17:31:23	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_BOEC_vers4_com_destaque.pdf	14/05/2017 17:29:53	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Outros	Relatorio_Parcial.pdf	14/05/2017 17:29:32	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_BOEC_emenda2_sem_marcacao.pdf	02/05/2017 16:01:06	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_BOEC_emenda2_marcado.pdf	02/05/2017 16:00:18	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_emenda.pdf	19/10/2016 08:18:09	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Outros	POP_Lab Ozelo_Biorrepositorio 2014 BOEC MP.pdf	07/10/2014 22:25:18		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 27 de Maio de 2017

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência de mutações germinativas e dinâmica clonal em pacientes com neoplasias mieloides

Pesquisador: Bruno Kosa Lino Duarte

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09323019.9.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.253.209

Apresentação do Projeto:

Resumo: As neoplasias mieloides constituem um grupo de neoplasias caracterizado pela proliferação de células dessa linhagem e representados fundamentalmente por três subgrupos: as síndromes mielodisplásicas (SMD), as neoplasias mieloproliferativas (NMP) e a leucemia mieloide aguda (LMA). As NMP são doenças cuja principal característica é a proliferação de células mieloides maduras. Elas podem ser associadas à presença da translocação BCR-ABL1—quando apresentam maior risco de progressão para leucemias agudas e falência medular. Quando não associadas a essa translocação apresentam como principal fonte de morbimortalidade a elevada incidência de eventos trombembólicos. As SMD têm como principal característica a hematopoiese ineficaz, que resulta em citopenias e elevada tendência à evolução para LMA. A LMA, por sua vez, caracteriza-se pela produção de células imaturas, com comprometimento da hematopoiese, tendo curso clínico agressivo e alta letalidade. A proliferação clonal das células da linhagem mieloide constitui-se no principal elemento da fisiopatologia dessas doenças. Recentemente estudos mostraram que, em oposição ao que se acreditava anteriormente, a evolução dessas neoplasias ocorre por uma dinâmica de competição darwiniana entre múltiplos clones. Fatores como mutações germinativas podem predispor ao desenvolvimento destas neoplasias e a persistência de clones residuais após o tratamento tem papel fundamental na recidiva. Neste estudo, pretendemos avaliar a prevalência de mutações germinativas associadas ao desenvolvimento de neoplasias mieloides. Através da tecnologia de sequenciamento massivamente paralelo (Next Generation Sequencing – NGS)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.253.209

avaliaremos a presença de mutações somáticas em leucócitos de sangue periférico e medula óssea de pacientes recém-diagnosticados com neoplasias mieloides. Confirmaremos por meio do sequenciamento de DNA de células de epitélio oral a origem germinativa das mutações suspeitas, e avaliaremos, através do sequenciamento realizado em momentos distintos do seguimento desses pacientes, a dinâmica clonal, bem como seu impacto no prognóstico desses pacientes.

Introdução: As neoplasias mieloides são as neoplasias hematológicas com origem na medula óssea, tendo como característica principal a proliferação de células desta linhagem, que se tornam circulantes, sendo por isso frequentemente denominadas “neoplasias líquidas” (Ferrando & Lopez-Otin, 2017). O uso deste termo transmite a facilidade com que se obtém material genético dessas doenças, uma vez que elas são amplamente acessíveis pelo sangue periférico ou através da punção de medula óssea.- **NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS.** As neoplasias mieloproliferativas (NMP) compreendem um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação clonal de células tronco-hematopoiéticas da linhagem mielóide, resultando na proliferação de células maduras em um ou mais tipos celulares da linhagem mielóide. A expressão clínica deste fenômeno é o achado, em graus variáveis, de leucocitose, plaquetose e poliglobulia (Spivak, 2017). Elas se dividem em dois grupos principais: as neoplasias mieloproliferativas relacionadas à translocação BCR-ABL1 (BCR, breaking cluster region; ABL1, abelson murine leukemia), representadas exclusivamente pela Leucemia Mieloide Crônica (LMC) e aquelas não associadas a essa translocação, representadas principalmente pela Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP). A LMC caracteriza-se pela proliferação acentuada de células maduras da linhagem mielóide, principalmente das séries granulocítica e megacariocítica. Sua incidência anual é de 1-2 casos por 100 mil adultos, com mediana de idade estimada em 68 anos (Huang, Cortes, & Kantarjian, 2012). Seu curso clínico é predominantemente assintomático e os sintomas, quando presentes, consistem de sintomas relacionados à anemia, perda de peso, mal-estar, saciedade precoce e dor no hipocôndrio esquerdo, esses dois últimos associados à esplenomegalia. Raramente, manifestações associadas à leucocitose extrema podem ocorrer. Sua fisiopatologia está relacionada à translocação BCR-ABL1, que produz uma proteína tirosinoquinase constitutivamente ativada que promove crescimento e replicação através de diversas vias de sinalização, incluindo RAS, MYC e STAT (Mandanas et al., 1993; Sawyers, Callahan, & Witte, 1992; Shuai, Halpern, ten Hoeve, Rao, & Sawyers, 1996). Apesar da apresentação clínica oligossintomática, virtualmente 100% dos casos, se não adequadamente tratados, evoluirão para leucemia mieloide aguda, (Jabbour & Kantarjian, 2016). Nesse sentido, o advento de um inibidor de tirosinoquinase específico para a proteína BCR-ABL1, o imatinibe, representou um avanço extraordinário no tratamento dessa doença (Hochhaus

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.253.209

et al., 2017). As NMP BCR-ABL1 negativas, por sua vez, estão frequentemente associadas à mutações somáticas em três genes. A principal delas é no gene JAK2 (Janus tyrosine kinase) (9p24). Sua forma mais comum, envolvendo o domínio não catalítico no exón 14, a JAK2V617F, encontra-se associada a 96% dos casos de policitemia vera (PV), 55% dos casos de trombocitemia essencial (TE) e 65% dos casos de mielofibrose primária (MFP) (Tefferi, 2010). Mutações em outros dois genes, o MPL (Myeloproliferative leukemia virus) (1p34.2) e o CALR (Calreticulin) (19p13.13) estão associados a 5 e 25-35% dos casos de TE e MFP, respectivamente (Nangalia et al., 2013). A PV é um distúrbio mieloproliferativo adquirido, cuja principal característica fisiopatológica é a hiperplasia das células hematopoiéticas, levando a um acentuado aumento da massa eritróide (Stuart & Viera, 2004). Apresenta uma incidência estimada em 1,2/100.000 pessoas por ano, sendo a doença mais comum entre as patologias mieloproliferativas. Embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, a idade média dos pacientes é de 60 anos, com leve predominância do sexo masculino (1,2:1) (Tefferi, 2013). A morbimortalidade associada a esta doença deriva principalmente da ocorrência de eventos trombóticos, sendo frequente a ocorrência de trombose mesentérica e em sistema nervoso central e menos frequente transformação para fase fibrótica ou leucemia aguda (Falanga & Marchetti, 2012). A TE, por sua vez, caracteriza-se pela expansão clonal de precursores hematopoiéticos envolvendo principalmente a linhagem megacariocítica, resultando no achado característico de plaquetose. Com uma incidência de 0,6-1,8/100.000 pessoas/ano (Titmarsh et al., 2014), a TE tem como principal manifestação clínica a ocorrência de eventos hemorrágicos, principalmente com contagens plaquetárias elevadas, particularmente acima de $1.250 \times 10^9/L$ (Campbell et al., 2012) e de eventos tromboembólicos, com acometimento preferencial de territórios arteriais (Carobbio et al., 2011). Em comum com a PV, encontramos a mesma tendência, embora de forma menos frequente, de evolução para fase fibrótica e leucemia aguda (Barbui et al., 2011). A MFP, por sua vez, caracteriza-se por um curso bifásico, com uma fase inicial com mieloproliferação clonal, cuja expressão clínica principal é o achado de plaquetose com ou sem leucocitose. Esta, pela ocorrência de fibrose medular reativa, osteoesclerose, angiogênese e hematopoese extramedular, associadas a um perfil anômalo de expressão de citocinas, evolui para uma fase fibrótica, caracterizada por anemia grave, hepatoesplenomegalia de grande monta, reação leucoeritroblástica e sintomas constitucionais (Tefferi, 2014). Sua incidência, na forma primária, é estimada entre 0,34-0,65/100.000 pessoas por ano (Titmarsh et al., 2014), e assim como a PV e a TE, encontra-se associada a manifestações hemorrágicas e tromboembólicas, sem preferência por território arterial ou venoso (Barbui et al., 2010). - SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS As síndrome mielodisplásicas caracterizam-se pelo

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

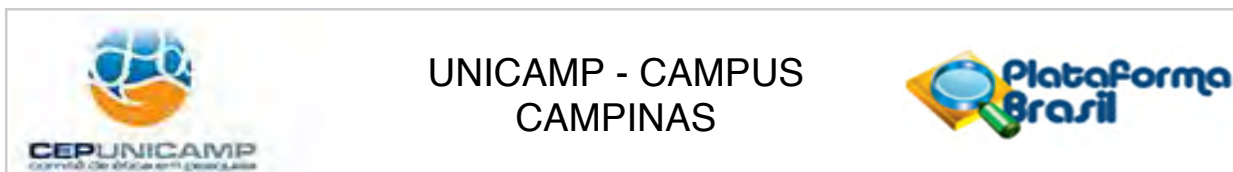
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.253.209

aumento de proliferação de células de linhagem mieloide sem capacidade adequada de diferenciação, o que resulta na apoptose dessas. Esse processo de hematopoiese ineficaz leva a um menor número de células circulantes, o que dá origem à principal manifestação das síndromes mielodisplásicas, as citopenias. A instabilidade clonal relacionada à hematopoiese ineficaz resulta num elevado risco de evolução para leucemia mieloide aguda (Tefferi & Vardiman, 2009). A incidência anual nos Estados Unidos é de aproximadamente 4 por 100 mil habitantes, acometendo principalmente homens com uma mediana de idade na sétima década de vida (Mufti, McLornan, van de Loosdrecht, Germing, & Hasserjian, 2018). Os sinais e sintomas são geralmente relacionados às citopenias, como fraqueza, palidez e manifestações hemorrágicas. Com frequência, a apresentação costuma ser assintomática e as alterações são identificadas em exames de rotina (Weinberg & Hasserjian, 2019). A etiopatogênese está relacionada a diversos fatores, com uma interação entre fatores ambientais (como exposições prévias a quimioterápicos, radioterapia e outros agentes mutagênicos), fatores genéticos e relacionados ao envelhecimento, resultando num cenário genômico complexo, caracterizado por diferentes mutações relacionadas a vias de sinalização intracelular e splicing de DNA. (Steensma, 2018). As opções terapêuticas são restritas, sendo a única modalidade terapêutica curativa, o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Ademais, os principais pilares terapêuticos são o suporte transfusional e o uso de fatores de crescimento para tratamento das citopenias, e mais recentemente, o uso de agentes hipometilantes, com intuito de restituir a hematopoiese e minimizar o risco de transformação para leucemia mieloide aguda. O uso desta droga, por sua vez, reforça a importância de mecanismos genéticos e epigenéticos, na progressão da doença. Esse fato é ainda mais reforçado pelo impacto prognóstico associado a determinadas alterações genéticas, incorporadas nos principais modelos prognósticos de sobrevida e risco de transformação (Greenberg et al., 2012). Além do risco de progressão para leucemia mieloide aguda e das citopenias, outra fonte de morbidade nesta patologia é a sobrecarga transfusional de ferro, que parece impactar negativamente na sobrevida de seus portadores (Shammo & Komrokji, 2018).

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA leucemia mielóide aguda apresenta o pior prognóstico entre as neoplasias mieloides. Caracteriza-se pela proliferação de células imaturas dessa linhagem, com consequente comprometimento da hematopoiese normal, levando a um quadro de insuficiência medular caracterizado por plaquetopenia e anemia de intensidade moderada a grave, associado à leucopenia com neutropenia ou a leucocitose acentuada, às custas de células imaturas, os blastos (Dohner, Weisdorf, & Bloomfield, 2015). Sua incidência anual é estimada 3-5 casos por 100.000 habitantes nos EUA, sendo a leucemia aguda mais comum no adulto, com mediana de idade em torno de 65 anos (Siegel, Miller, & Jemal, 2015).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.253.209

Clinicamente, a doença apresenta início abrupto, com rápida evolução dos sintomas, representados pelas manifestações decorrentes das citopenias (cansaço, fraqueza e mal-estar resultantes da anemia; sangramentos, resultantes da plaquetopenia e febre e infecções, resultantes das neutropenia), além daquelas observadas em decorrência do excesso de leucócitos, como tontura, alteração do nível de consciência e dispnéia. Eventualmente pode ocorrer a infiltração de tecidos extramedulares, com a formação de tumores, os chamados sarcomas mieloides (Dohner et al., 2015). Do ponto de vista da fisiopatologia, a leucemia mieloide aguda pode surgir de uma neoplasia hematológica subjacente, como as SMD ou as NMP, como consequência de um tratamento quimioterápico prévio para outra neoplasia ou, como na maioria dos casos, de novo, em pacientes previamente saudáveis (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016). Independente da origem, porém, a LMA está relacionada a um conjunto de alterações genéticas que comprometem o processo de maturação normal dos precursores mieloides, sendo as alterações cromossômicas e as mutações no DNA os principais eventos iniciadores dessa neoplasia (Patel et al., 2012). Essas mutações abrangem um grande número de processos intracelulares, como splicing de DNA, vias de sinalização, fatores de transcrição, metilação do DNA, modificadores de cromatina e genes supressores de tumores, entre outros (Cancer Genome Atlas Research et al., 2013). Tamanha instabilidade genômica acarreta agressividade e refratariedade às terapêuticas convencionais. A mediana de sobrevida em indivíduos com menos de 65 anos é de cerca de 18-20 meses, não alcançando 12 meses para indivíduos com mais de 60-65 anos (Dohner et al., 2017; Dohner et al., 2015). Das opções terapêuticas atuais, em indivíduos com prognóstico não favorável, o transplante alogênico de medula óssea é a única terapêutica capaz de oferecer chances de cura superiores a 50%. -DINÂMICA CLONAL EM NEOPLASIAS MIELOIDES. As neoplasias mieloides são proliferações clonais de células da linhagem mieloide. O entendimento sobre a dinâmica desses clones foi bastante limitado até recentemente. Tradicionalmente, acreditava-se que a evolução clonal nessas neoplasias era explicada por uma arquitetura clonal linear, com clones subsequentes incorporando e ampliando mutações de clones precursores (Nowell, 1976). Estudos recentes têm rompido com esse modelo tradicional de arquitetura clonal linear, estabelecendo um cenário onde subpopulações de células com capacidade de auto renovação geram, mantêm e propagam as neoplasias mieloides, através de um padrão de arquitetura clonal ramificada, que evolui a partir de pressões seletivas no sentido Darwiniano da palavra (Jan & Majeti, 2013). Esse novo modelo coloca a dinâmica clonal como agente etiológico e prognóstico dos mais fundamentais nas neoplasias mieloides, lançando luz no processo de desenvolvimento, progressão e recidiva dessas neoplasias. -A DINÂMICA CLONAL NAS NEOPLASIAS

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.253.209

MIELOIDES: PREDISPOSIÇÃO RELACIONADA A MU-TAÇÕES GERMINATIVAS E HEMATOPOIESE CLONAL DE SIGNIFICADO INCERTO. As síndromes de predisposição familiar ao câncer foram descritas pela primeira vez em 1969, quando Li e Fraumeni identificaram famílias com elevada incidência de neoplasias e subsequentemente identificaram mutações germinativas no gene supressor tumoral p53 como a causa (Li & Fraumeni, 1969). Desde então, novas mutações têm sido adicionadas ao rol dessas síndromes. Diferente das mutações identificadas somente no tecido neoplásico, essas são germinativas, afetando todos os órgãos e tecidos do indivíduo, resultando na predisposição a diversos tipos de câncer e na hereditariedade das características associadas a essas mutações. Com relação às neoplasias mieloides, especificamente, várias entidades já foram associadas a sua predisposição, a partir, inicialmente, da observação de agrupamentos familiares de pacientes com LMA e SMD (Wartiovaara-Kautto et al., 2018). Dados recentes mostram um aumento de 2x no risco de neoplasias mieloides em parentes de primeiro grau de indivíduos com esses diagnósticos (Sud et al., 2018) e estimam em até 30% a prevalência de mutações germinativas associadas ao desenvolvimento de neoplasias mieloides em famílias com dois ou mais indivíduos com LMA e/ou SMD (Churpek et al., 2015). A frequência e relevância dessas síndromes de predisposição levou, em 2016, ao reconhecimento, pela Organização Mundial de Saúde, da entidade “Neoplasias mielóides com predisposição germinativa” como uma categoria diagnóstica (Arber et al., 2016). Dos diversos genes associados à predisposição germinativa para o desenvolvimento de neoplasias mieloides, a OMS reconheceu os seguintes: RUNX1, CEBPA, DDX41, ANKRD26, ETV6, GA-TA2 e os genes envolvidos nas síndromes de falência medular (DBA) e nas doenças de telômeros (TERC e TERT, entre outros). Entre esses genes, o RUNX1 foi o primeiro a ser descrito, em 1999, e até hoje é um dos mais prevalentes (Song et al., 1999). Apesar da ampla documentação da relevância de mutações germinativas nos genes supracitados no desenvolvimento de neoplasias mieloides, observa-se que a penetrância dos mesmos é muito variável e os mecanismos pelos quais isso ocorre não estão completamente elucidados (Churpek et al., 2015; Wartiovaara-Kautto et al., 2018). Tomando-se, por exemplo, as neoplasias mieloides associadas a mutações germinativas do gene RUNX1, vários trabalhos com caracterização genética de indivíduos portadores dessa mutação que desenvolveram neoplasias mieloides têm sido publicados recentemente. No maior deles, Antony-Debre e colaboradores (Antony-Debre et al., 2016) sequenciaram 11 indivíduos de famílias portadoras de mutação no gene RUNX1 diagnosticados com LMA/SMD, encontrando, em todos eles, perda do alelo RUNX1 funcional, atribuindo a este fato o mecanismo de transformação para neoplasias mieloides nesse cenário. Outros trabalhos, porém, como de Yoshimi e colaboradores (Yoshimi et al., 2014) identificaram em

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.253.209

4 de 6 pacientes de famílias portadoras de mutações no gene RUNX1 que desenvolveram LMA/SMD, mutações no gene CDC25C, que sintetiza uma proteína associada com a progressão do ciclo celular. Não foram encontradas anomalias no alelo RUNX1 funcionante de nenhum desses pacientes. Observa-se, portanto, a falta de consenso sobre a dinâmica clonal através da qual, pacientes com mutações que predispõe a neoplasias mieloides desenvolvem essas doenças. A elucidação destes poderia, no futuro, resultar na prevenção ou no tratamento muito precoce dessas doenças. Também não há, na literatura, dados confiáveis sobre a prevalência de mutações germinativas em pacientes diagnósticos com LMA/SMD, particularmente na população brasileira. Ainda, com relação ao papel da evolução clonal na etiopatogenia das neoplasias mieloides, recentemente foi descrita a hematopoiese clonal de significado indeterminado (CHIP). Esta entidade foi relatada, pela primeira vez, nos trabalhos de Jaiswal e colaboradores (Jaiswal et al., 2014) e Genovese e colaboradores (Genovese et al., 2014) que observaram a ocorrência de mutações somáticas em genes associados às SMD (DNMT3A, ASXL1, TET2, entre outros) em células hematopoiéticas de indivíduos com hemograma normal e sem qual-quer outro indício de doença hematológica. Essas mutações foram detectadas em mais de 2% das células hematopoiéticas em 5-10% dos indivíduos com 70 anos ou mais, alcançando uma frequência de 18.4% em indivíduos com 90 anos ou mais, resultando num risco de desenvolvimento subsequente de uma neoplasia hematológica 11 vezes maior que em indivíduos sem essas mutações (numa taxa de progressão de para neoplasia mielóide de cerca de 0.5 a 1.0% por ano). Foi observada também uma mortalidade 1.4 vezes maior nesses indivíduos. Posteriormente, um trabalho do grupo de Jaiswal mostrou que o maior risco de morte de portadores estava relacionado a um risco cardiovascular aumentado, com maior aterogênese em um modelo animal com mutações no gene TET2 (Jaiswal et al., 2017). Os mecanismos pelos quais indivíduos com CHIP apresentam evolução clonal para neoplasias mieloides ainda não estão completamente elucidados. Recentemente dois grupos identificaram genes cuja mutação em pacientes com CHIP estava mais frequentemente associada ao desenvolvimento de LMA. Desai e colaboradores (Desai et al., 2018) identificaram 212 mulheres do estudo Women's Health Initiative com material genético disponível, saudáveis no momento do seu ingresso e que desenvolveram LMA numa mediana de 9.6 anos. O resultado do sequenciamento do DNA de leucócitos dessas mulheres foi comparado com o de 212 controles saudáveis que não desenvolveram LMA. As mutações nos genes IDH1, IDH2, TP53, DNMT3A, TET2 e em genes de splicing associaram-se a um maior risco de desenvolvimento de LMA. No caso dos genes TP53 e IDH1/IDH2, 100% das pacientes com mutações nesses genes desenvolveram LMA. Abelson e colaboradores (Abelson et al., 2018), por sua vez, sequenciaram o DNA de 95 indivíduos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

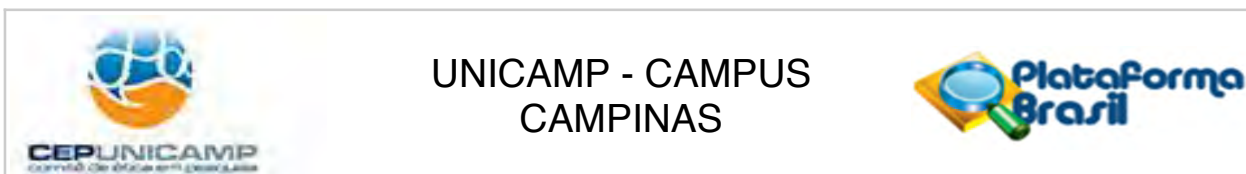
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.253.209

com LMA, obtido numa mediana de 6.3 anos antes do diagnóstico e compararam o resultado com sequenciamento de DNA de leucócitos de 414 controles que não desenvolveram essa doença. Os indivíduos que desenvolveram LMA tinham um maior número de mutações, com maior carga alélica e maior frequência de mutações nos genes de splicing, TP53, DNMT3A e TET2. Esses achados, embora realcem a importância e contribuam para o entendimento sobre como a dinâmica clonal modela o desenvolvimento de neoplasias mieloides, não esclarecem de maneira definitiva essa questão, deixando clara a necessidade de mais estudos para a maior compreensão desses mecanismos. A DINÂMICA CLONAL NAS NEOPLASIAS MIELOIDES: O IMPACTO PROGNÓSTICO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA E DA ALTERNÂNCIA CLONAL. Como observado anteriormente, a coexistência em múltiplos clones com propriedades funcionais distintas, em constante competição, molda a evolução e o prognóstico das neoplasias mieloides. Diversos trabalhos, tanto no âmbito da LMA (Cancer Genome Atlas Research et al., 2013; Papaemmanuil et al., 2016; Patel et al., 2012), quanto no âmbito da SMD (Haferlach et al., 2014; Schwartz et al., 2017) e das NMP (Grinfeld et al., 2018; Lundberg et al., 2014) tem destacado o impacto prognóstico das diferentes mutações e das interações entre elas no prognóstico, ao diagnóstico, das diferentes neoplasias mieloides. O impacto dessas mutações não se dá de maneira isolada, mas depende em grande parte da interação entre as mesmas, destacando a importância da interação entre os diferentes clones. Da mesma forma, a mutação de determinados genes pode conferir um impacto prognóstico negativo em uma das neoplasias mieloides e ser neutro na outra, ou pode não ter impacto prognóstico quando presente de maneira isolada, mas impactar negativamente em conjunto com outras mutações. Esse impacto prognóstico não se restringe somente ao cenário genômico encontrado no diagnóstico. Diversos estudos, tanto no cenário da LMA quanto da SMD, têm destacado o papel da presença de clones residuais, tanto após o tratamento quimioterápico inicial, como após o TCTH, como fator de impacto prognóstico negativo. Num estudo recente, Jongen-Lavrencic e colaboradores (Jongen-Lavrencic et al., 2018) analisaram a persistência de mutações somáticas em 482 pacientes entre 18 e 65 anos de idade com LMA (428) ou SMD de alto risco (54), tratados uniformemente com quimioterapia convencional e em remissão completa após o tratamento. Desses, 89.2% apresentavam alguma mutação ao diagnóstico, que persistiu durante a remissão completa em 51.4%, em frequências alélicas entre 2 e 47%, dos quais 78.7% tinham mutações em DNMT3A, 54.2% em TET2 e 51.6% em ASXL1, mutações frequentemente associadas a CHIP. Após exclusão dessas mutações, pacientes que ainda persistiam com alguma mutação (indicando a presença de um clone leucêmico residual) com fração alélica superior a 2.5% tinham um risco de recidiva de 55.4% vs. 31.9%—risco relativo de 2.14, $P < 0,001$. A persistência desses

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.253.209

clones impactou também a sobrevida global, que foi de 41.9% no grupo com persistência comparado com 66.1% no grupo sem persistência (risco relativo de 2.06, com $P < 0,001$). De maneira análoga, Rothenberg-Thurley e colaboradores (Rothenberg-Thurley et al., 2018) observaram que a persistência de mutações com fração alélica superior a 2% durante a remissão em 126 pacientes com LMA esteve associada a maior risco de recidiva (risco relativo de 2.34). Diferente de Jongen-Lavrencic, porém, mesmo a persistência de mutações associadas a CHIP (DNMT3A, TET2 e ASXL1) esteve associada a um maior risco de recidiva. Morita e colaboradoras (Morita et al., 2018) obtiveram resultados semelhantes, mostrando que não só a presença ou ausência dessas mutações, mas também a frequência alélica em que elas estão presentes, impacta negativamente no risco de recidiva de pacientes com LMA em remissão completa. Aqui, a remoção das mutações associadas a CHIP potencializava o poder prognóstico da persistência de mutações, embora o impacto prognóstico existisse mesmo quando essas mutações eram incluídas na análise. Finalmente, Duncavage e colaboradores (Duncavage et al., 2018) mostraram a importância prognóstica da persistência de mutações somáticas após transplante células-tronco hematopoiéticas (TCTH) em pacientes com SMD. Em 90 pacientes adultos submetidos a esse procedimento, 37% tinham pelo menos uma mutação com frequência alélica de pelo menos 0.5% 30 dias após o transplante. Esses pacientes tinham um risco de progressão após o transplante de 3.86 vezes (53.1 vs. 13.0%) em relação aos pacientes onde nenhuma mutação com frequência acima de 0.5% era detectada. O conjunto desses achados reforça a importância da dinâmica clonal, ao diagnóstico e ao seguimento, no prognóstico das neoplasias mieloides. Não há ainda, porém, caracterização suficiente que permita saber exatamente quais pacientes apresentarão desfechos desfavoráveis sendo fundamental reforçar que aproximadamente 25% dos pacientes com persistência do clone leucêmico não apresentarão recidiva da doença, o que expõe o hiato existente no conhecimento acerca do poder prognóstico da dinâmica clonal em neoplasias mieloides.

Metodologia Proposta: Serão solicitadas amostras de 4 ml de sangue periférico e 4 ml de medula óssea, coletadas em EDTA (2 tubos com 4 ml) de cada participante da pesquisa para o sequenciamento, ao diagnóstico e ao longo do seguimento. Para sequenciamento de DNA oriundo de células do epitélio oral, estas serão coletadas através de swab oral, com o kit Oragene® OG-500.5.2.1. **PESQUISA DE MUTAÇÕES RELACIONADAS A NEOPLASIAS MIELÓIDES EM LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA E CÉLULAS DE EPITÉLIO ORAL.** Baseado em publicações anteriores mostrando o impacto na etiopatogenia das neoplasias mielóides, um painel de 48 genes (ASXL1; BCOR; BCORL1; BOD1L; BRAF; BRCC3; CALR; CBL; CEBPA; CSF3R; CUX1; DNMT3A; ETV6;

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.253.209

EZH2; FLT3; GATA1; GATA2; GNAS; GNB1; IDH1; IDH2; JAK2; KDM6A; KIT; KRAS; MPL; NF-E2; NF1; NPM1; NRAS; PHF6; PTPN11; RAD21; RIT1; RUNX1; SETBP1; SF3B1; SH2B3; SMC1A; SMC3; SRSF2; STAG2; TET2; TLR2; TP53; U2AF1; WT1; ZRSR2) foi selecionado para sequenciamento através da técnica de sequenciamento massivamente paralelo (Next Generation Sequencing) usando a tecnologia de semicondutor iônico IonTorrent® (Rothberg et al., 2011). Resumidamente, a técnica consiste da extração de DNA genômico com o kit PreA-nalytix (Qiagen®) e realização de uma reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para posterior geração de amplicons dos genes de interesse a partir do kit Ion Ampliseq® HIFI (ThermoFisher®). Posteriormente os amplicons são marcados para sequenciamento em uma nova reação de PCR usando uma solução marcadora constituída por Ion P1 adaptor® e Ion Xpress Barcode X® (Quiagen®). Finalmente, através da tecnologia de semicondutor iônico, os amplicons são sequenciados. Com o objetivo de determinar se as mutações encontradas no DNA extraído de leucócitos de pacientes com neoplasias mieloides são somáticas ou germinativas, será extraído DNA de células de mucosa oral obtidos através de coleta com swab. O DNA obtido dessas células será analisado por NGS, seguindo a técnica descrita acima, para a pesquisa de mutações encontradas no DNA de leucócitos.

Critério de Inclusão: Serão convidados a participar desse estudo adultos (maiores de 18 anos) atendidos no Hemocentro e no Hospital de Clínicas da UNICAMP, recém-diagnosticados com neoplasias mieloides (leucemia mieloide aguda de novo e secundária, síndromes mielodisplásicas e neoplasias mieloproliferativas, incluindo leucemia mieloide crônica, mielofibrose primária, policitemia vera e trombocitemia essencial).

Critério de Exclusão: Pacientes que já tenham recebido alguma forma de tratamento quimioterápico (exceto hidroxiureia);

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o perfil genético das neoplasias mieloides recém-diagnosticadas em uma população brasileira.

Objetivo Secundário:

a) Avaliar a prevalência de mutações germinativas previamente descritas como associadas à predisposição de neoplasias mieloides em pacientes recém-diagnosticados com estas doenças através de sequenciamento massivamente paralelo (Next Generation Sequencing – NGS) de leucócitos oriundos de medula óssea e sangue periférico colhidos ao diagnóstico; b) Avaliar a aquisição ou perda de mutações (dinâmica clonal) nesses pacientes ao longo do seguimento, através de sequenciamento massivamente paralelo (NGS) de leucócitos oriundos de medula óssea

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.253.209

e sangue periférico colhidos ao longo do seguimento desses pacientes;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos relacionados a participação nesse estudo se limitam aos riscos relacionados aos procedimentos necessários para coleta de sangue periférico, medula óssea e swab oral. Para a coleta de sangue periférico os riscos são dor e formação de hematoma no local da punção. A probabilidade desses riscos é baixa. Para a coleta de medula óssea, os riscos são dor, sangramento e infecção do sítio de punção. A probabilidade dos dois primeiros é moderada, da última, baixa. Destacamos que esses dois procedimentos serão realizados como parte da rotina de assistência do paciente e que não haverá necessidade de realização desses procedimentos somente para fins do estudo. Por fim, com relação ao swab oral, o risco é somente de dor e desconforto, ambos com probabilidade baixa.

Benefícios: Os resultados desse estudo podem ajudar no desenvolvimento de exames que ajudem a detectar o risco de uma pessoa desenvolver uma neoplasia mielóide e de exames que ajudem a prever o risco de recidiva dessas doenças

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este é um projeto de doutorado do Dr. Bruno Kosa Lino Duarte, com orientação da Profa. Dra. Margareth Castro Ozelo (orientadora)

Tem início previsto para 01/04/2019 e orçamento de R\$ 173.000,00 e financiamento da USP.

Serão avaliados 50 participantes com neoplasias mielóides.

O termo de consentimento está adequado e baseado no modelo do Comitê de Ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados os seguintes documentos:

- 1) PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1309980.pdf
- 2) arquivo.pdf com a cópia da carteira de identidade funcional do pesquisador, como médico do HEMOCENTRO.
- 3) Projeto_dinamica_clonal.pdf
- 4) TCLE_Dinamica_clonal.pdf
- 5) POP_Biorrepositorio_dinamica_clonal.pdf
- 6) folha_de_rosto.pdf assinada pela Profa. Dra. Margareth Castro Ozelo, coordenadora do HEMOCENTRO

Recomendações:

- 1-Inserir no TCLE junto ao item "Ressarcimento e Indenização" a informação: "Você terá a garantia

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.253.209

ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa." O texto como foi descrito no TCLE não garante indenização por danos decorrentes da pesquisa. A Resolução 466/12 (item IV.3) define que "os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no TCLE, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas". Cabe enfatizar que a questão da indenização não é prerrogativa da Resolução 466/12, estando prevista no código civil. Portanto, solicitamos que seja assegurado, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa tem direito à indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com Recomendações (Vide item acima "Recomendações")

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. 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 à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com 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 e aguardando a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

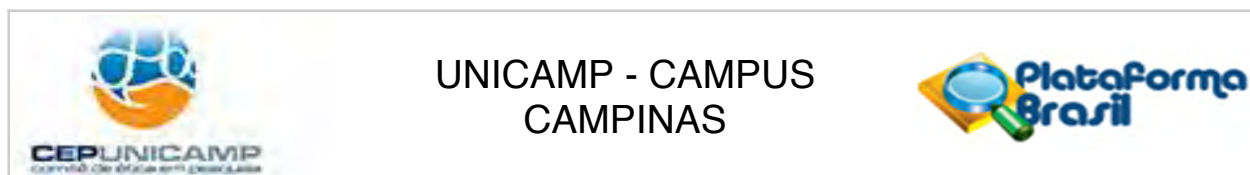
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.253.209

aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1309980.pdf	11/03/2019 21:30:37		Aceito
Outros	arquivo.pdf	11/03/2019 21:29:26	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_dinamica_clonal.pdf	07/03/2019 19:47:52	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Dinamica_clonal.pdf	07/03/2019 19:47:42	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	POP_Biorrepositorio_dinamica_clonal.pdf	07/03/2019 19:47:33	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	07/03/2019 19:47:25	Bruno Kosa Lino Duarte	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

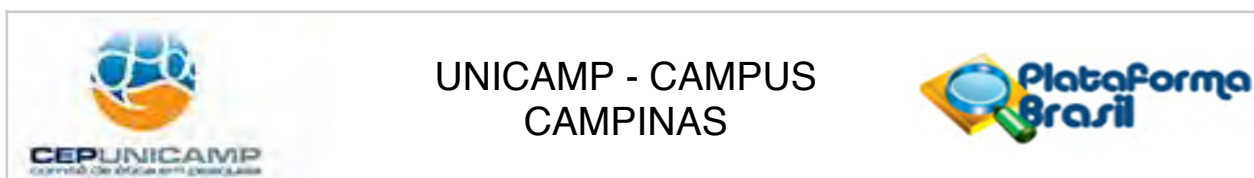
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.253.209

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 09 de Abril de 2019

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br