



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

KRISTINA HUNDAROVA

***AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS,
EOSINÓFILOS E MONÓCITOS NO PROGNÓSTICO DA
MIELOFIBROSE PRIMÁRIA***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROF.^ª DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO
DRA. MARTA ISABEL DE CORREIA PEREIRA

MARÇO/2017

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS
DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE
PRIMÁRIA

Kristina Hundarova¹

¹Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Correio Electrónico: kristina.hundarova@hotmail.com

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

Este artigo foi escrito ao abrigo do antigo Acordo Ortográfico.

ÍNDICE

Abreviaturas	5
1. RESUMO	7
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUÇÃO.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
1. Revisão bibliográfica.....	18
2. Estudo clínico retrospectivo	18
5. RESULTADOS	20
A. Caracterização clínica descritiva dos doentes	20
1. Análise descritiva da amostra.....	20
2. Caracterização clinico-laboratorial da amostra	21
2.1 Impacto prognóstico dos valores de hemoglobina nos doentes com MFP da nossa amostra	22
2.2 Impacto prognóstico da contagem total de leucócitos nos doentes com MFP da nossa amostra	23
2.3 Impacto prognóstico da contagem de plaquetas nos doentes com MFP da nossa amostra.....	26
2.4 Avaliação dos valores de LDH nos doentes com MFP da nossa amostra.....	28
2.5 Impacto prognóstico das contagens de blastos no sangue periférico dos doentes com MFP da nossa amostra.....	29
2.6 Estratificação dos doentes com MFP estudados na nossa amostra segundo o score prognóstico DIPSS-plus	31
3. Sobrevivência Global da amostra.....	32
4. Sobrevivência Livre de Progressão	33
B. Influência da monocitose, eosinofilia e basofilia no prognóstico dos doentes com MFP	34
5. Influência prognóstica da monocitose nos doentes com MFP	34
5.1. Análise descritiva dos doentes com monocitose	34
5.2. Influência da monocitose na sobrevivência global dos doentes com MFP	35
6. Influência prognóstica da eosinofilia nos doentes com MFP	38
6.1. Análise descritiva dos doentes com eosinofilia.....	38
6.2. Influência da eosinofilia na sobrevivência global dos doentes com MFP.....	39
7. Influência prognóstica da basofilia nos doentes com MFP	42
7.1. Análise descritiva dos doentes com basofilia.....	42
7.2. Influência da basofilia na sobrevivência global dos doentes com MFP.....	43

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

8.	Alteração em pelo menos um parâmetro	45
8.1.	Influência da alteração de pelo menos um parâmetro analítico na sobrevivência global.....	46
9.	Tratamento com ruxolitinib.....	48
9.1.	Influência do tratamento com ruxolitinib na sobrevivência global dos doentes com MFP.....	48
9.2.	Monocitose e tratamento com ruxolitinib.....	49
9.3.	Eosinofilia e tratamento com ruxolitinib.....	50
9.4.	Basofilia e tratamento com ruxolitinib	51
6.	DISCUSSÃO.....	53
7.	CONCLUSÃO.....	63
8.	AGRADECIMENTOS	64
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	65

ABREVIATURAS

BCR-ABL – Gene de Fusão entre BCR (*Breakpoint Cluster Region*) e ABL (*Abelson Kinase*)

CALR – Calreticulína

COMFORT – Estudo Controlado Sobre o Tratamento da Mielofibrose com Inibidores JAK por Via Oral (*Controlled MyeloFibrosis study with ORal JAK Inhibitor Treatment*)

CTCAE – Critérios de Terminologia Comum para Eventos Adversos (*Common Terminology Criteria for Adverse Events*)

DIPSS – Sistema de Score Prognóstico Dinâmico Internacional (*Dynamic International Prognostic Scoring System*)

E.P.E. – Entidade Pública Empresarial

FGFR1 – Receptor do Factor de Crescimento Derivado dos Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*)

HUC-CHUC — Hospitais da Universidade de Coimbra do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

IL – Interleucina

IPSS – Sistema de Score Prognóstico Internacional (*International Prognostic Scoring System*)

JAK – *Janus Kinase*

LDH – Desidrogenase Láctica

LMA – Leucemia Mieloblástica Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crónica

LMCa – Leucemia Mielóide Crónica atípica

LMMC – Leucemia Mielomonocítica Crónica

LSN – Limite Superior de Normalidade

MeSH – Medical Subject Headings

MFP – Mielofibrose Primária

AValiação DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

MPL – Receptor de Trombopoietina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PDGFRA – Receptor Alfa do Factor de Crescimento Derivado das Plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*)

PDGFRB – Receptor Beta do Factor de Crescimento Derivado das Plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta*)

PV – Policitemia Vera

SMD – Síndrome(s) Mielodisplásica(s)

STAT – Factores Transdutores do Sinal e Activadores da Transcrição (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)

NMP – Neoplasia(s) Mieloproliferativa(s)

TE – Trombocitemia Essencial

UCM – Último Contacto Médico

1. RESUMO

A mielofibrose primária é uma neoplasia mieloproliferativa caracterizada pela fibrose progressiva da medula óssea, que evolui para falência medular, com o desenvolvimento de citopenias ou, em alguns doentes, para transformação leucémica.

Uma vez que se trata de uma patologia que reduz significativamente a sobrevivência dos doentes, a avaliação prognóstica e divisão dos doentes em grupos de risco são fundamentais para a selecção da abordagem terapêutica adequada a cada grupo.

Estudos recentes vieram a demonstrar que o desenvolvimento de monocitose em doentes diagnosticados com mielofibrose primária estava associado a progressão mais rápida da doença e redução significativa da sobrevivência global. Também em doentes com síndromes mielodisplásicas o desenvolvimento de monocitose foi associado a pior prognóstico.

Por outro lado, recentemente têm sido produzidos vários estudos a relacionar a presença de eosinofilia e basofilia em doentes com síndromes mielodisplásicas com uma redução da sobrevivência global. Sabe-se também que a presença de basofilia em doentes com leucemia mielóide crónica está associada à fase de aceleração da doença. No entanto, a importância exacta quer da eosinofilia e da basofilia, quer da monocitose no momento de diagnóstico, no prognóstico dos doentes com mielofibrose primária permanece incerta.

Deste modo, nós avaliamos, através de um estudo retrospectivo, a importância prognóstica da monocitose, eosinofilia e basofilia identificadas ao diagnóstico, em 55 doentes com diagnóstico de mielofibrose primária estabelecido nos Hospitais da Universitários de Coimbra do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E. –entre 1 de Janeiro de 2005 e 30 de Agosto de 2016.

Através da consulta dos processos clínicos foi feito o levantamento dos valores de eosinófilos, basófilos e monócitos (no sangue periférico) aquando do diagnóstico de mielofibrose primária, em todos os doentes seleccionados. Seguidamente foi avaliado o impacto destes parâmetros na sobrevivência global e na sobrevivência livre de progressão para leucemia.

AValiação DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

Na nossa série, e tendo por base os valores de referência do hospital onde o estudo foi realizado, foram encontrados 11 doentes com monocitose (monócitos $> 1 \times 10^9$ /L), 7 doentes com eosinofilia (eosinófilos $> 0,6 \times 10^9$ /L) e 17 doentes com basofilia (basófilos $> 0,2 \times 10^9$ /L). Nos doentes com monocitose, observou-se uma redução na sobrevivência global. Nos doentes com eosinofilia, a sobrevivência mediana foi cinco vezes inferior quando comparados aos doentes sem eosinofilia ao diagnóstico. De igual modo, nos doentes com basofilia também se observou uma redução da sobrevivência global, ao fim de 2 anos de seguimento. Foi feito o cálculo de um novo valor de corte com valor prognóstico, para os três parâmetros estudados, observando-se com o valor de monócitos $< 0,75 \times 10^9$ /L um maior benefício em termos de sobrevivência. O mesmo foi verificado na aplicação de valores de eosinófilos $< 0,25 \times 10^9$ /L e de basófilos $< 0,25 \times 10^9$ /L, quando comparados com os *cut-offs* inicialmente aplicados. Contudo, devido à dimensão da amostra, este estudo não teve o poder estatístico adequado para alcançar a significância estatística.

Este estudo sugere que a avaliação da contagem absoluta dos monócitos, dos eosinófilos e dos basófilos na mielofibrose primária ao diagnóstico poderá apresentar relevância prognóstica. Como tal, a inclusão destes parâmetros em *scores* prognósticos actualmente utilizados poderá vir a complementar o espectro de variáveis presentemente incluídas, para otimizar a sua acuidade prognóstica.

Considerando que a significância estatística não foi atingida em nenhuma das análises supra-descritas, para validação destes resultados será importante realizar estudos prospectivos com inclusão de maior número de doentes para alcançar o poder estatístico necessário.

Palavras chave: Mielofibrose Primária; Síndromes Mieloproliferativas; Monocitose; Eosinofilia; Basofilia; Prognóstico.

2. ABSTRACT

Primary myelofibrosis is a myeloproliferative neoplasm characterized by progressive bone marrow fibrosis, with progression to bone marrow failure and development of cytopenias or, in some cases, progression to acute leukemia.

Since this disease significantly reduces the overall survival of patients, prognostic evaluation and stratification of patients into risk-based subgroups are of the utmost importance, in order to appropriately choose the therapeutic management for each group.

Recent studies have shown that the development of monocytosis in patients with established primary myelofibrosis is associated with rapid disease progression and significant reduction of overall survival. Some studies on patients with myelodysplastic syndromes also showed that the development of monocytosis throughout the course of the disease associates with a poor prognosis.

On other hand, recent studies have shown that the presence of eosinophilia and basophilia in patients with myelodysplastic syndromes associates with a significant reduction in overall survival. It is also known that the presence of basophilia in patients with chronic myeloid leukemia is associated with the accelerated phase of the disease. However, little is known about the prognostic impact of basophilia and eosinophilia, and of monocytosis at diagnosis, in patients with primary myelofibrosis.

We retrospective studied the prognostic importance of monocytosis, eosinophilia and basophilia at diagnosis in 55 patients diagnosed with primary myelofibrosis at Hospitais da Universidade de Coimbra do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E., between the 1st January 2005 and the 30th August 2016.

Patient charts were reviewed and the values of eosinophilia, basophilia and monocytosis (in peripheral blood) at the time of the diagnosis of primary myelofibrosis were recorded and included in prognostic analyses of overall survival and leukemia-free survival.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

In our study, according to the reference values of the hospital where this study was performed, we identified 11 patients with monocytosis (monocytes $> 1 \times 10^9$ /L), 7 patients with eosinophilia (eosinophils $> 0,6 \times 10^9$ /L) and 17 patients with basophilia (basophils $> 0,2 \times 10^9$ /L). Monocytosis was associated with a reduction in overall survival. In patients who presented with eosinophilia, the overall survival was five times lower than in those without eosinophilia. In patients who presented with basophilia, a reduction of the overall survival was also observed, after 2 years of follow-up. We also calculated new cut-off values for these three prognostic parameters, observing that an absolute monocyte count $< 0,75 \times 10^9$ /L was associated with greater benefit in terms of overall survival. The same was found with the eosinophil counts $< 0,25 \times 10^9$ /L and basophil counts $< 0,25 \times 10^9$ /L, when compared with initial cut-offs. Nevertheless, due to the small size of the sample, the study was underpowered to achieve statistical significance.

This study suggests that the evaluation of the value of monocytes, eosinophils and basophils in patients with primary myelofibrosis at diagnosis has prognostic relevance. The inclusion of these parameters in currently used scores may complement the spectrum of variables with the goal of optimizing prognostication in primary myelofibrosis.

Considering that statistical significance wasn't reached in any of the analyses previously described due to underpowering, in order to validate these results new prospective studies with the inclusion of a larger number of patients will be necessary.

Key-words: Primary Myelofibrosis; Myeloproliferative Syndromes; Monocytosis; Eosinophilia; Basophilia; Prognosis.

3. INTRODUÇÃO

A mielofibrose primária (MFP) é uma doença neoplásica clonal que resulta de alterações na célula progenitora pluripotencial hematopoiética associadas a fibrose da medula óssea, osteosclerose, angiogénese e hematopoiese extramedular, acompanhada de expressão anómala de citocinas.¹ (Tabela I)

Várias mutações pontuais foram relacionadas com o desenvolvimento desta patologia, destacando-se: a mutação JAK2 V617F (*Janus kinase*), presente em 50 a 60% dos casos; mutações no gene CALR (calreticulina) em cerca de 25% dos doentes; e a mutação MPL W515L/K, no receptor da trombopoietina, em menos de 10%.¹⁻⁴

Tabela I – Critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) 2008 e 2016 para o diagnóstico de MFP

	Critérios OMS 2008 para o diagnóstico de MFP	Critérios OMS 2016 para o diagnóstico de MFP
Critérios Major	Proliferação de megacariócitos e atipia ou reticulina e/ou fibrose.	Proliferação de megacariócitos e atipia acompanhada por reticulina e/ou fibrose de grau 2 ou 3.
	Não apresentar critérios de OMS compatíveis com LMC, policitémia vera (PV), trombocitémia essencial (TE) ou outras neoplasias mielóides.	Não apresentar critérios de OMS compatíveis com LMC, PV, TE, SMD ou outras neoplasias mielóides.
	Demonstração de JAK2V617F ou outro marcador clonal, ou não apresentar evidência de fibrose reactiva da medula óssea.	Presença de mutações nos genes JAK2, CALR ou MPL ou, na ausência de mutações nestes 3 genes, presença de outro marcador monoclonal, ou ausência de mielofibrose reactiva.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

	Leucoeritroblastose	Leucoeritroblastose
Critérios <i>Minor</i> (confirmados por 2 determinações consecutivas)	Aumento dos níveis de desidrogenase láctica (LDH) sérica.	Aumento dos níveis séricos de LDH acima dos valores de referência.
	Anemia	Anemia não atribuída a outra comorbilidade.
	Esplenomegália palpável.	Esplenomegália palpável
		Leucocitose $\geq 11 \times 10^9 /L$

Para o diagnóstico é preciso que estejam presentes os 3 critérios *major* e pelo menos 1 *minor*.

A tabela de critérios de OMS 2008 foi adaptada de Vardiman, et al., 2009³ e a tabela de critérios OMS 2016 foi adaptada de Arber, et al., 2016⁵

A descoberta mais importante para a compreensão da fisiopatologia da MFP foi a identificação de um aumento na sinalização através da via do JAK nas células eritróides e mielóides dos doentes com MFP, resultante da activação constitutiva da função desta tirosina-cinase.⁶ Esta activação, por sua vez, conduz à desregulação da transdução do sinal dependente de JAK, activando múltiplos factores de transcrição, incluindo o STAT3 e STAT5. (Figura 1) Deste modo, a desregulação na sinalização JAK-STAT é o principal mecanismo responsável pela fisiopatologia da MFP, tendo um papel importante na mieloproliferação, na angiogénese, na migração das células da linha germinativa, e no desenvolvimento do estado pró-inflamatório observado nos doentes com MFP e a caquexia dele resultante.⁶ Contudo, e apesar de a mutação JAK V617F ser a mutação somática mais prevalente em doentes com MFP, esta não parece ser o principal evento promotor do desenvolvimento da doença; de facto, os mecanismos primários responsáveis pela iniciação da MFP permanecem incertos, traduzindo uma complexidade genética e epigenética desta neoplasia, e das NMP no geral.⁶ Neste contexto, verificou-se que as mutações no gene MPL são igualmente responsáveis pela fosforilação constitutiva da tirosina-cinase JAK2 com aumento na activação desta via,^{6,7} e que também mutações no gene CALR são responsáveis, indirectamente, por aumentar a

sinalização através da via JAK-STAT, com aumento da fosforilação de STAT5; no entanto, o mecanismo exacto ainda está por esclarecer.⁸

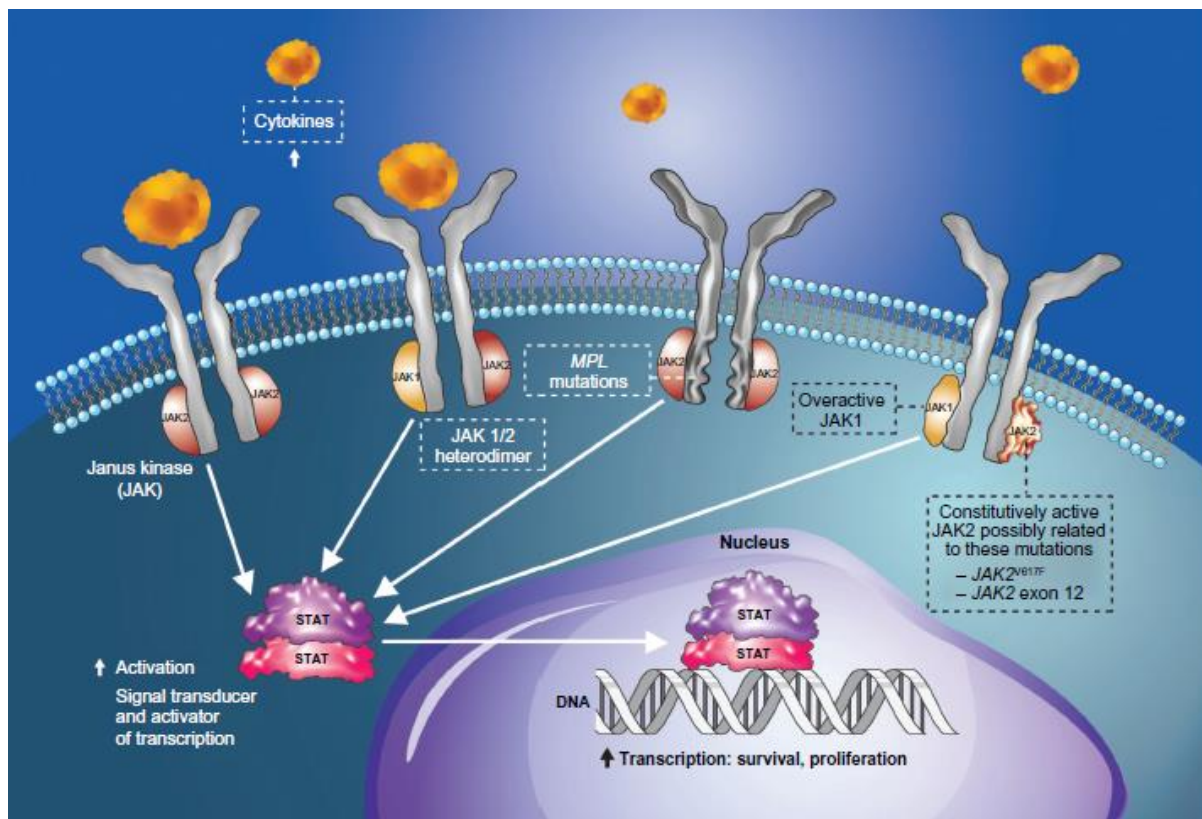


Figura 1 – Patogénese da MFP envolvendo a activação constitutiva da via de sinalização da tirosina-cinase JAK2. Mutações que afectam a função do receptor das citocinas (tem-se como exemplo as mutações no receptor de trombopoietina – MLP) ou mutações no gene de JAK2, levam à activação constitutiva desta via de sinalização com aumento na activação de JAK-STAT nas células tronco hematopoiéticas, resultando em mieloproliferação e produção excessiva de citocinas inflamatórias.

Imagem adaptada de Mughal, TI. et al., 2014.⁶

A idade média de apresentação da MFP situa-se nos 67 anos, com maior prevalência no género masculino.⁹ A doença pode ter uma progressão clínica variável com um período de evolução entre 1 a 30 anos, sendo semiologicamente variável, desde formas assintomáticas até à falência progressiva da medula óssea; as principais causas de morte nestes doentes incluem a progressão

para leucemia aguda, em 10 a 20% dos casos, eventos cardiovasculares, infecções e hemorragias, condicionados pelas citopenias.^{1,2}

Uma vez que a MFP é uma patologia com o potencial de reduzir significativamente a sobrevivência global dos doentes, quando comparados com a população geral, foram desenvolvidos vários *scores* para estratificar o prognóstico dos doentes com MFP. Um dos primeiros a ser desenvolvido foi o *score* de Lille, publicado em 1996, que se baseava em apenas dois parâmetros prognósticos: a anemia (hemoglobina < 10 g/dL) e uma contagem absoluta de leucócitos baixa (< 4 x 10⁹/L) ou elevada (> 30 x 10⁹/L).¹⁰ Este *score*, permitia separar os doentes em 3 grupos de risco: baixo (0 factores), intermédio (1 factor) e alto (2 factores), associando os doentes a uma sobrevivência mediana de 93 meses, 26 meses e 13 meses, respectivamente.¹⁰ Em 2009, foi desenvolvido o *International Prognostic Scoring System* (IPSS), baseado em 5 parâmetros preditores de sobrevivência global mais curta: idade > 65 anos, hemoglobina < 10 g/dL, leucocitose > 25 x 10⁹/L, blastos circulantes ≥ 1% e sintomas constitucionais.¹¹ Este *score* separa os doentes em 4 grupos de risco: baixo (0 factores), intermédio-1 (1 factor), intermédio-2, (2 factores) e alto (≥ 3 factores), estando os grupos associados a uma sobrevivência mediana de 135 meses, 95 meses, 48 meses e 27 meses, respectivamente.¹¹ Uma vez que o *score* IPSS apenas pode ser aplicado uma vez, ao diagnóstico, sendo insensível à evolução do doente, foi desenvolvido um *score* dinâmico (*Dynamic International Prognostic Scoring System – DIPSS*) que pudesse ser utilizado em qualquer ponto no decurso da doença, avaliando para isso os parâmetros definidos pelo *score* IPSS, associando, contudo, 2 pontos ao factor anemia, e mantendo apenas 1 ponto para cada um dos outros parâmetros.⁴ (Tabela II)

Estudos recentes demonstraram que as anomalias genéticas e cariotípicas desfavoráveis estão associadas a um pior prognóstico em doentes com MFP; como tal, actualmente, a estratificação de risco é feita com base no *score Dynamic International Prognostic Scoring System – plus* (DIPSS-*plus*) que utiliza 8 parâmetros: idade > 65 anos, hemoglobina < 10 g/dL, leucocitose > 25 x 10⁹/L,

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

blastos circulantes $\geq 1\%$, sintomas constitucionais, dependência de transfusões, contagem de plaquetas $< 100 \times 10^9/L$ e cariótipo desfavorável.^{4,9,12,13} Este *score* divide os doentes em 4 grupos de risco: baixo (0 pontos), intermédio-1 (1 ponto), intermédio-2 (2-3 pontos) e alto (4-6 pontos), com uma sobrevivência global mediana de 185 meses, 78 meses, 35 meses e 16 meses, respectivamente.⁴ (Tabela II)

Tabela II – Sistemas de classificação para estimar o prognóstico em doentes com MFP

IPSS (2009)		DIPSS – <i>Plus</i> (2011)	
Anemia ($< 10 \text{ g/dL}$)		Anemia ($< 10 \text{ g/dL}$)	
Leucocitose ($> 25 \times 10^9/L$)		Leucocitose ($> 25 \times 10^9/L$)	
Blastos no sangue periférico ($\geq 1\%$)		Blastos no sangue periférico ($\geq 1\%$)	
Sintomas constitucionais		Sintomas constitucionais	
Idade > 65 anos		Idade > 65 anos	
---		Cariótipo desfavorável*	
---		Contagem de plaquetas ($< 100 \times 10^9/L$)	
---		Dependência de transfusões	
Categoria de risco	Número de factores de risco	Categoria de risco	Número de factores de risco
<u>Baixo</u>	0	<u>Baixo</u>	0
<u>Intermédio-1</u>	1	<u>Intermédio-1</u>	1
<u>Intermédio-2</u>	2	<u>Intermédio-2</u>	2-3
<u>Alto</u>	≥ 3	<u>Alto</u>	4-6

*O cariótipo desfavorável inclui a presença cariótipo complexo ou anomalias que incluam os seguintes rearranjos: +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p-, inv(3) ou 11q23.

A tabela referente ao score IPSS foi adaptada de Cervantes, et al., 2009¹¹ e a tabela referente ao score DIPSS-*plus* foi adaptada de Gangat, et al., 2011¹³

AValiação da InFLUência das Contagens de Basófilos, Eosinófilos e Monócitos NO PRoGNóstico da MIELOFIBROSE PRIMária

Várias análises publicadas recentemente têm demonstrado que os doentes com MFP apresentam um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (nomeadamente IL-6 e IL-8), e que as suas concentrações plasmáticas elevadas se relacionam com o fenótipo clínico da doença, potenciando, através da resposta inflamatória, a fibrose da medula óssea, a angiogénese e a hematopoiese extramedular, contribuindo para a presença de sintomas constitucionais, dependência transfusional e leucocitose, bem como para a diminuição da sobrevivência global e livre de transformação leucémica.¹⁴ Por outro lado, sabe-se que as referidas citocinas são produzidas por megacariócitos clonais, monócitos, basófilos e células do estroma não clonais, em indivíduos saudáveis. Alguns estudos associam a presença de monocitose, em doentes com MFP, a pior prognóstico e progressão mais rápida da patologia.¹⁵ Também em doentes com síndromes mielodisplásicas (SMD), a presença de monocitose foi associada a pior prognóstico.^{4,15,16} Adicionalmente, o valor das contagens monocitárias parece revestir-se de um valor prognóstico transversal em várias patologias hemato-oncológicas; de facto, vários estudos atribuem um elevado valor prognóstico ao rácio linfócitos/monócitos em doentes com linfoma de Hodgkin, estando os valores inferiores a 2 associados a pior prognóstico.¹⁷ Por outro lado, estudos em doentes com linfoma não Hodgkin difuso de grandes células B demonstraram que as contagens absolutas de monócitos e as de linfócitos apresentam um valor prognóstico superior ao do rácio linfócitos/monócitos e neutrófilos/linfócitos.¹⁸

A eosinofilia e basofilia são achados típicos das patologias mieloproliferativas, estando frequentemente presentes em doentes com leucemia mielóide crónica (LMC), nos quais a basofilia, com ou sem a presença de eosinofilia, é tipicamente encontrada na fase de aceleração da doença.¹⁹ A basofilia foi também descrita como uma variável independente definidora de prognóstico em doentes com LMC.²⁰ Por outro lado, há estudos que sugerem pior prognóstico e progressão mais rápida da doença na presença simultânea de contagens elevadas de basófilos e de eosinófilos em doentes com LMC ou SMD.^{20,21} No entanto, a importância exacta da eosinofilia e basofilia no

AValiação DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

prognóstico dos doentes com neoplasias mieloproliferativas (NMP) BCR-ABL-negativas permanece incerta.

Em relação à terapêutica, o ensaio COMFORT (*COntrolled MyeloFibrosis study with ORal JAK Inhibitor Treatment*) avaliou a segurança e eficácia do ruxolitinib, um inibidor potente e selectivo de JAK1/JAK2 em doentes de baixo risco.^{22,23} Este ensaio evidenciou, durante a fase III, que o ruxolitinib é mais eficaz do que o placebo e as terapêuticas convencionais no prolongamento da sobrevivência dos doentes com MFP. Apresenta efeitos na redução da esplenomegalia (superior à obtida com a hidroxiureia), uma melhoria dos sintomas constitucionais mediados por altos níveis de citocinas e uma melhoria do estado nutricional, sendo um fármaco seguro, na medida em que não foi associado ao aumento do risco de morte por infecção, hemorragia ou eventos cardiovasculares.^{22,23}

Com o presente estudo pretende-se averiguar o impacto prognóstico da eosinofilia, basofilia e monocitose estabelecidas ao diagnóstico em doentes com MFP. Para tal foram avaliadas as contagens absolutas, aquando do diagnóstico, de monócitos, eosinófilos e basófilos no sangue periférico de doentes com MFP diagnosticados e seguidos nos Hospitais da Universidade de Coimbra do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E. (HUC-CHUC), entre 1 de Janeiro de 2005 e 30 de Agosto de 2016.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Revisão bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi efectuada através da base de dados de artigos médicos PubMed. Utilizaram-se como palavras-chave os termos MeSH “primary myelofibrosis”, “myeloproliferative neoplasms”, “monocytosis”, “eosinophilia”, “basophilia”, “prognosis” e “myelodysplastic syndromes”, isoladamente e em diferentes associações, mediante a evolução da pesquisa. Foram triados os artigos com resumo disponível e seleccionaram-se aqueles com acesso a texto completo, em língua inglesa, espanhola, russa ou portuguesa. Na sùmula bibliográfica apresentada na Introdução foi dado maior ênfase aos artigos publicados mais recentemente.

2. Estudo clínico retrospectivo

Identificaram-se os doentes com um diagnóstico de MFP estabelecido nos HUC-CHUC entre 01 de Janeiro de 2005 e 30 de Agosto de 2016 e seguidos neste mesmo Centro Hospitalar, através do confronto de resultados da pesquisa dos relatórios anatomopatológicos, dos relatórios de hematocitologia, das notas de alta de internamento e da base de dados de prescrição farmacológica de ruxolitinib.

Após o levantamento dos processos clínicos identificados, os respectivos diagnósticos anatomopatológicos foram revistos no contexto da actualização de 2016 da classificação da OMS das neoplasias mielóides e leucemias agudas (*World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*)⁵. Foram critérios de exclusão: 1) o incumprimento dos critérios de diagnóstico da OMS 2016; 2) a ausência de dados anatomopatológicos e laboratoriais suficientes para avaliação da aplicação dos critérios da OMS 2016; 3) o diagnóstico inicial ter sido realizado fora dos HUC-CHUC; 4) o seguimento ter sido realizado fora dos HUC-CHUC; 5) a inexistência no processo clínico de todos os dados clínicos ou laboratoriais em estudo, nomeadamente um hemograma síncrono com a biópsia óssea.

AValiação DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

Os processos clínicos seleccionados para inclusão no estudo foram consultados aprofundadamente, recolhendo-se sistematicamente os dados demográficos; as datas de nascimento, diagnóstico, progressão e último contacto médico (UCM); e os seguintes resultados laboratoriais ao diagnóstico, à data de progressão e à data do UCM: contagem de leucócitos, contagem absoluta de eosinófilos, basófilos, monócitos, neutrófilos, contagem de blastos na medula óssea e no sangue periférico, contagem absoluta de plaquetas, concentração de hemoglobina, e LDH.

Foram considerados como critério de eosinofilia uma contagem absoluta de eosinófilos $> 0,6 \times 10^9 /L$ (*cut-off* do nosso Centro Hospitalar); como critério de basofilia uma contagem absoluta de basófilos $> 0,2 \times 10^9 /L$ (*cut-off* do nosso Centro Hospitalar); e como critério de monocitose uma contagem absoluta de monócitos $> 1 \times 10^9 /L$, de acordo com o valor definido pela Sociedade Americana de Hematologia ²⁴. A transformação para leucemia mieloblástica aguda (LMA) foi definida pela presença de $\geq 20\%$ de blastos na medula óssea ou no sangue periférico.

A análise de sobrevivência foi realizada segundo o método de Kaplan-Meier e a significância estatística calculada segundo os métodos de Wilcoxon e do *log-rank*. Foram considerados como estatisticamente significativos valores de p inferiores a 0,05.

5. RESULTADOS

A. Caracterização clínica descritiva dos doentes

1. Análise descritiva da amostra

Foram incluídos no estudo 55 doentes com o diagnóstico de MFP, segundo os critérios de OMS 2016, estabelecido entre 01 de Janeiro de 2005 e 30 de Agosto de 2016 nos HUC-CHUC, com follow-up realizado no mesmo hospital, e com dados necessários e suficientes no seu processo clínico para se proceder à análise estatística. Cerca de 73% dos doentes eram do sexo masculino. (Figura 2)



Figura 2 – Distribuição dos doentes com MFP por género. Foram estudados 55 doentes com diagnóstico de MFP estabelecido entre 01 de Janeiro de 2005 e 30 de Agosto de 2016.

A mediana de idades dos doentes à data do diagnóstico de MFP foi de $70,1 \pm 11,7$ anos.

Utilizando o ponto de corte validado no IPSS, no DIPSS e no DIPSS-*plus* como tendo validade prognóstica nos doentes com MFP (65 anos, tabela II), verificámos que na nossa coorte, 43 doentes (78,2%) tinham idade superior a 65. Nestes doentes, a sobrevivência global foi inferior (mediana de 28,6 meses *versus* 56,1 meses nos doentes com menos de 65 anos, $p=NS$), conforme previsto. (Figura 3)

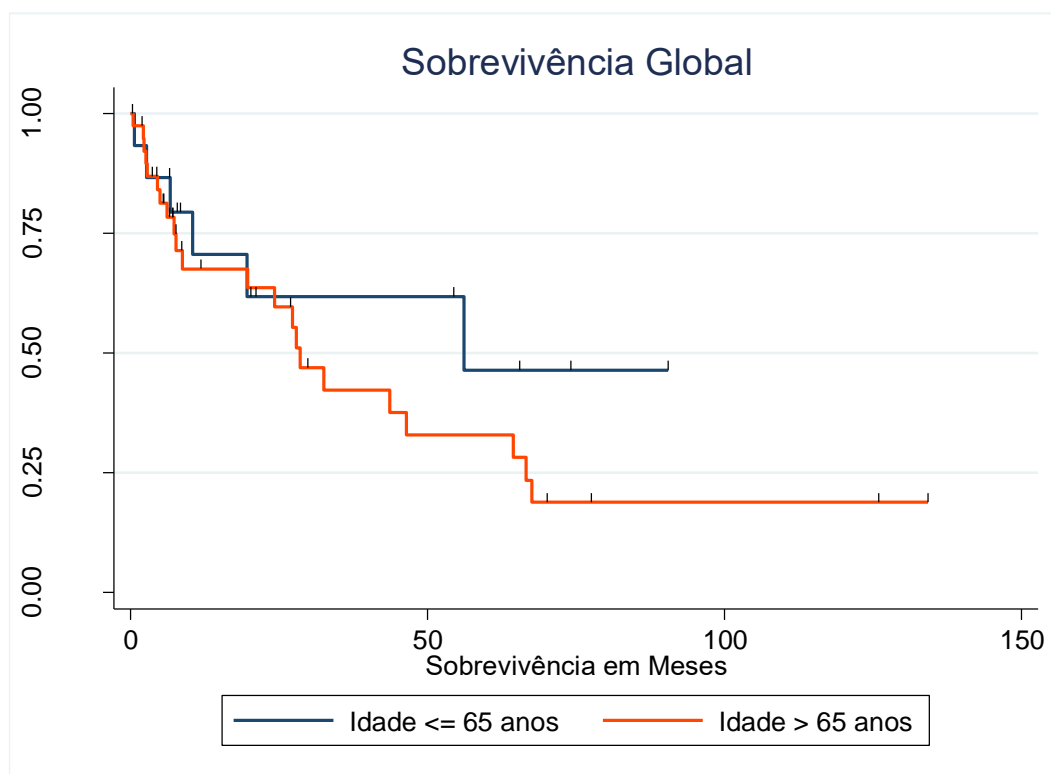


Figura 3 – Impacto da idade na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com idade ≤ 65 anos e a curva a **vermelho** representa os doentes com idade > 65 anos. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. O nível de significância para a diferença encontrada entre as curvas não foi atingido.

2. Caracterização clínico-laboratorial da amostra

Para caracterizar a nossa amostra de acordo com os parâmetros prognósticos actualmente utilizados procedeu-se à avaliação do impacto na sobrevivência global dos diferentes parâmetros prognósticos, nomeadamente dos valores da hemoglobina, dos leucócitos (e, dentro destes, dos neutrófilos), das plaquetas e da blastémia; foram igualmente avaliados os valores de LDH nos doentes da nossa amostra.

2.1 Impacto prognóstico dos valores de hemoglobina nos doentes com MFP da nossa amostra

Na avaliação dos valores de hemoglobina, verificou-se que 13 doentes (23,6%) não apresentaram anemia à altura do diagnóstico; entre os que apresentavam anemia na altura do diagnóstico da MFP, 6 doentes (10,9%) tinham anemia grave, de acordo com os critérios da OMS, 24 doentes (43,6%) apresentaram anemia moderada e 12 doentes (21,8%) tinham anemia ligeira.

(Figura 4)

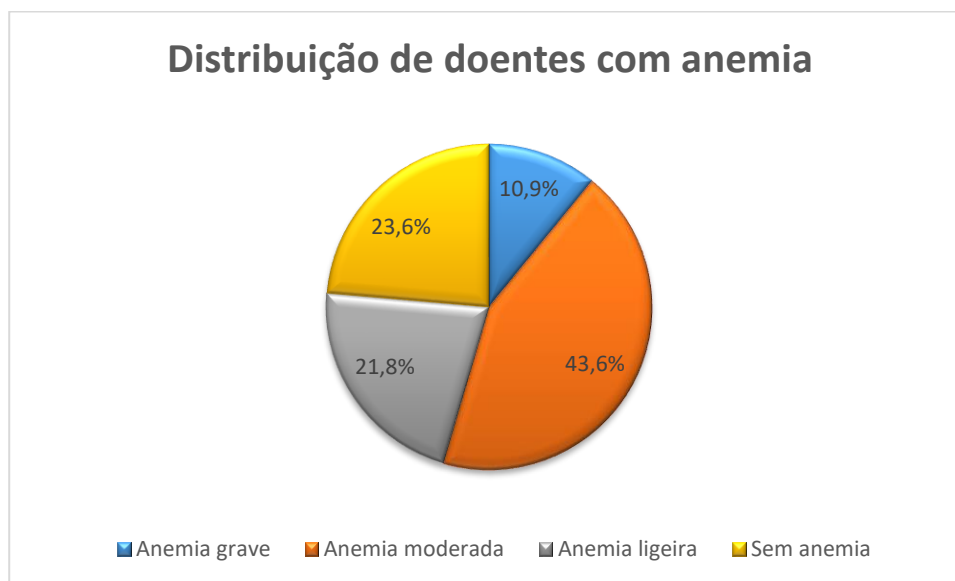


Figura 4 – Distribuição dos doentes com anemia por graus de severidade de acordo com a classificação da OMS. 6 doentes apresentavam anemia grave, 24 doentes tinham anemia moderada ao diagnóstico, e em 12 doentes a anemia era ligeira. 13 doentes não apresentavam anemia.

Utilizando o ponto de corte validado no IPSS, no DIPSS e no DIPSS-*plus* como tendo validade prognóstica nos doentes com MFP, verificámos que na nossa coorte 25 doentes (45,4%) tinham valores de hemoglobina superiores a 10 g/dL, e 30 doentes (54,6%) apresentavam um valor de hemoglobina < 10 g/dL. Observou-se uma relação estatisticamente significativa entre a presença de anemia e a redução da sobrevivência global dos doentes com MFP, (figura 5) verificando-se que a

sobrevivência global mediana dos doentes com valor de hemoglobina < 10 g/dL foi de 10,4 meses, versus 67,6 meses em doentes com níveis de hemoglobina superiores a esse valor (p=0,0036).

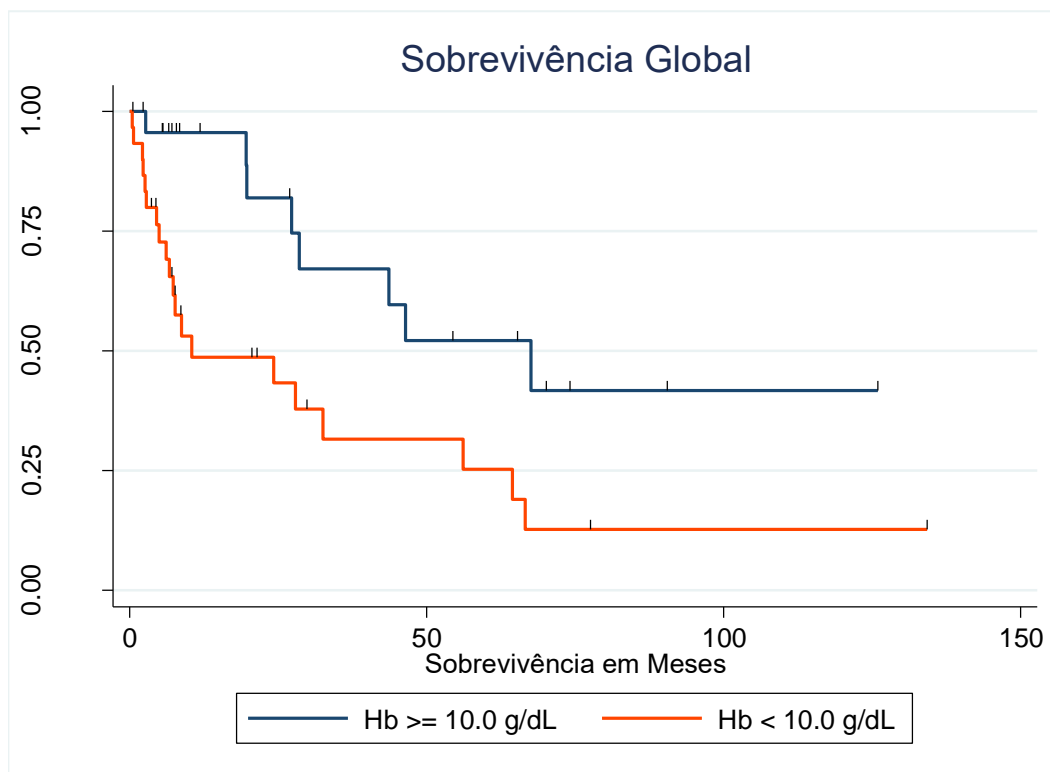


Figura 5 – Impacto do valor de hemoglobina na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a azul representa os doentes com valor de hemoglobina ≥ 10 g/dL e a curva a vermelho representa os doentes com o valor de hemoglobina < 10 g/dL. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. p = 0,0036

2.2 Impacto prognóstico da contagem total de leucócitos nos doentes com MFP da nossa amostra

Ao realizar a contagem total de leucócitos, observou-se, de acordo com os critérios de *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE), que 9 doentes (16,4%) apresentavam leucopenia (valor de leucócitos < 4 G/L) aquando do diagnóstico da MFP, 20 doentes (36,4%) apresentavam contagens normais de leucócitos, e 26 doentes (47,3%) apresentavam leucocitose (contagens de leucócitos > 10 G/L). (Figura 6)

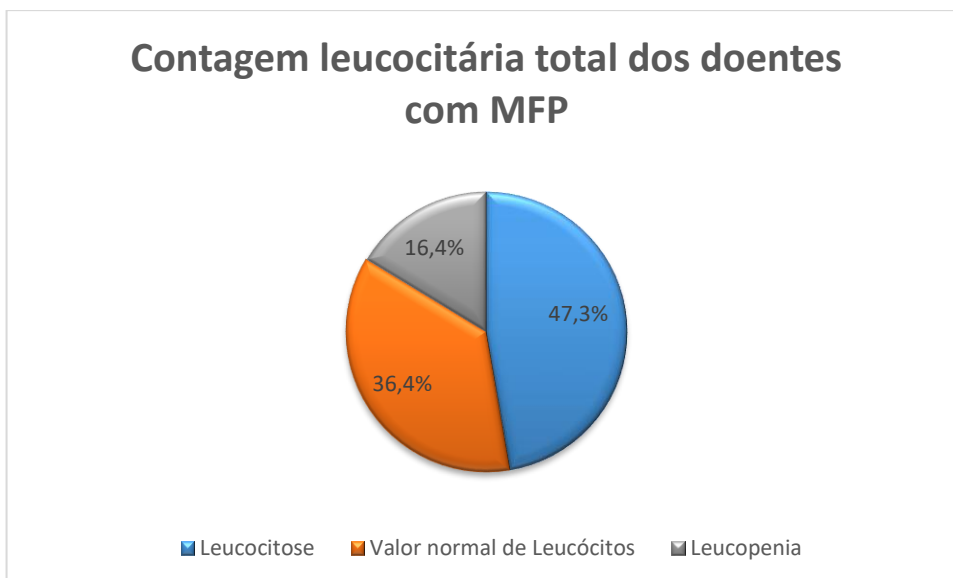


Figura 6 – Contagem leucocitária total dos doentes com MFP. 9 doentes apresentavam leucopenia, 20 doentes tinham contagens totais normais de leucócitos, e 26 doentes apresentavam leucocitose aquando do diagnóstico da MFP, de acordo com os critérios de CTCAE.

Para avaliar o impacto da leucocitose na sobrevivência global dos doentes, utilizou-se o valor de leucocitose constante nos *scores* prognósticos actualmente utilizados (IPSS e DIPSS-*plus*, leucócitos > 25 G/L, tabela II), tendo-se observado que 9 doentes (16,4%) apresentavam um valor de leucócitos superior a esse limite e 46 doentes (83,6%) apresentavam uma contagem leucocitária inferior a 25 G/L, ao diagnóstico. Observou-se uma sobrevivência global mediana de 28,6 meses em doentes que apresentavam contagens leucocitárias superiores ao valor de corte supra-referido, e uma sobrevivência global mediana de 32,5 meses em doentes com contagens de leucócitos inferiores. (Figura 7) Não foi atingido o nível de significância estatística. (p=NS)

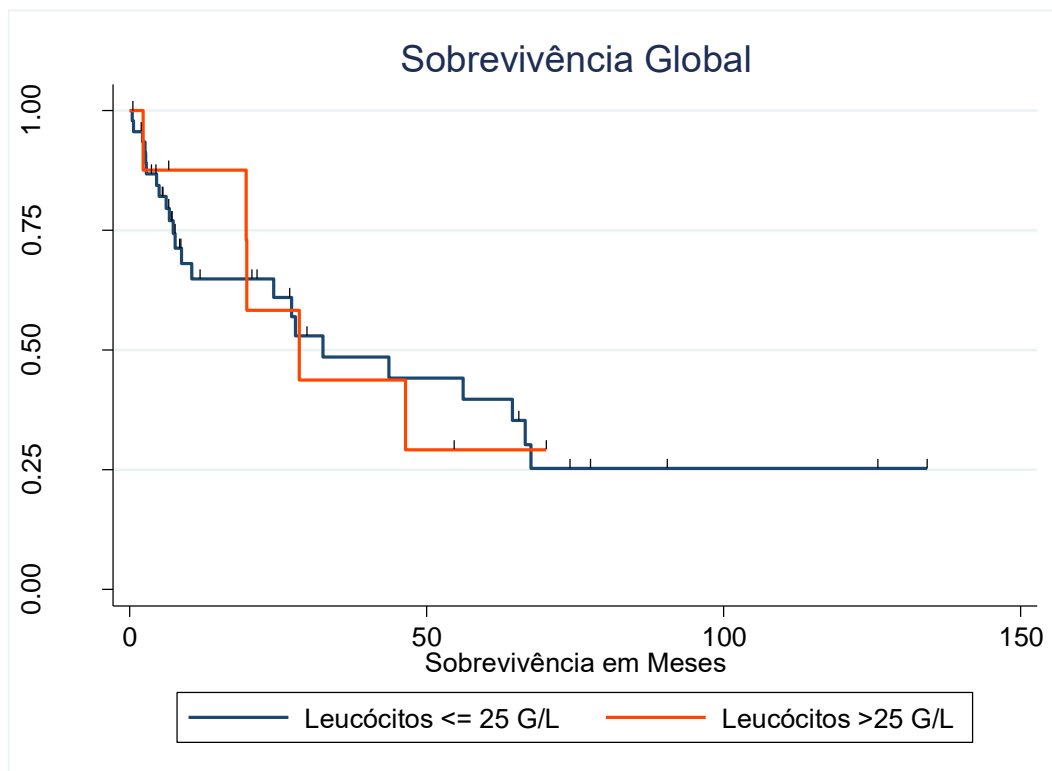


Figura 7 – Impacto da contagem total de leucócitos na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com contagem total de leucócitos ≤ 25 G/L e a curva a **vermelho** representa os doentes com contagem de leucócitos > 25 G/L. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. A significância estatística não foi atingida.

Foi também feita a contagem de neutrófilos dos doentes com MFP, quando do diagnóstico da patologia, tendo-se observado que 21 doentes (38,2%) apresentavam neutrofilia, 29 doentes (52,7%) apresentavam contagens normais de neutrófilos e 5 doentes (9,1%) apresentavam neutropenia. (Figura 8) Entre os doentes com neutropenia, de acordo com a classificação da CTCAE da neutropenia, 2 doentes (3,6%) apresentavam neutropenia ligeira (neutrófilos $< 1,5$ G/L), também 2 doentes (3,6%) tinham neutropenia moderada (neutrófilos $< 1,5 - 1$ G/L), nenhum doente apresentou neutropenia grave (neutrófilos $< 1 - 0,5$ G/L), e houve 1 doente (1,8%) com neutropenia muito grave (neutrófilos $< 0,5$ G/L).

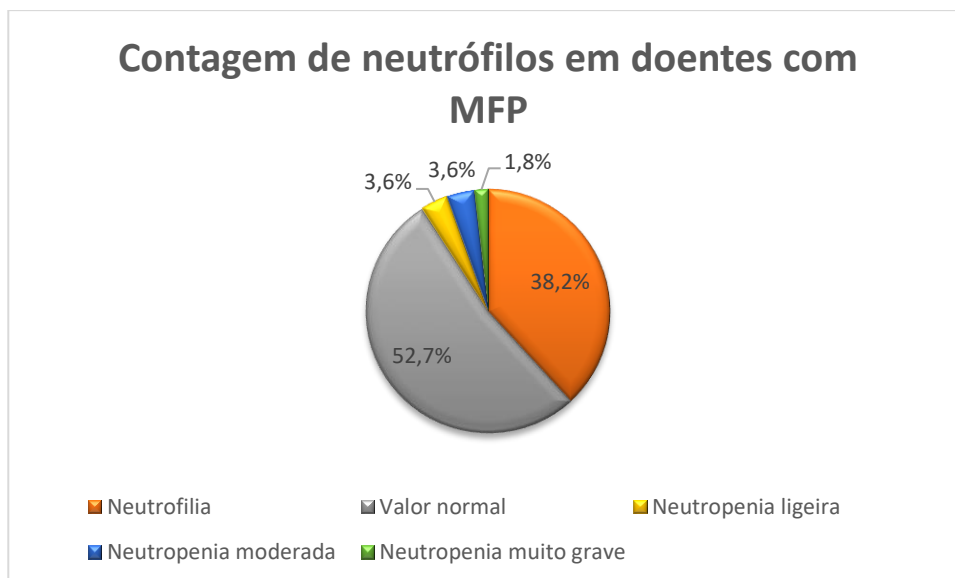


Figura 8 – Contagem de neutrófilos dos doentes com MFP. 21 doentes apresentavam neutrofilia, 29 doentes tinham contagens normais de neutrófilos, e 5 doentes apresentavam neutropenia aquando do diagnóstico da MFP, entre os doentes com neutropenia, 2 doentes se apresentaram com neutropenia ligeira, também 2 doentes tinham neutropenia moderada e 1 doente apresentava neutropenia grave, de acordo com a classificação de CTCAE.

2.3 Impacto prognóstico da contagem de plaquetas nos doentes com MFP da nossa amostra

Na avaliação das contagens das plaquetas em doentes da nossa coorte, observou-se que 9 doentes (16,4%) apresentavam trombocitose (contagem de plaquetas > 400 G/L, de acordo com a OMS), 28 doentes (50,9%) apresentavam contagens normais de plaquetas e 18 doentes (32,7%) apresentavam trombocitopenia (contagem de plaquetas < 150 G/L, de acordo com a OMS), (figura 9) entre estes, de acordo com a classificação da CTCAE, 4 doentes (7,3%) apresentavam uma trombocitopenia ligeira (plaquetas < 150 – 75 G/L), 5 doentes (9,1%) apresentavam uma trombocitopenia moderada (plaquetas < 75 – 50 G/L), 8 doentes (14,5%) tinham trombocitopenia grave (plaquetas < 50 – 25 G/L) e 1 doente (1,8%) apresentou trombocitopenia muito grave (plaquetas < 25 G/L).

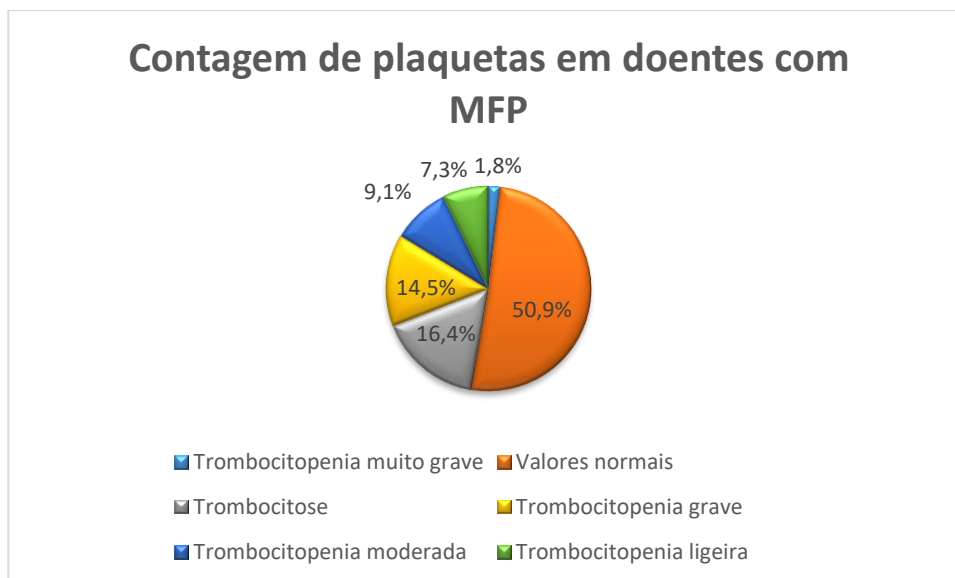


Figura 9 – Contagem de plaquetas em doentes com MFP. 9 doentes apresentavam trombocitose, 28 doentes tinham contagens normais de plaquetas, e 18 doentes apresentavam trombocitopenia, quando do diagnóstico da MFP. Entre os doentes com trombocitopenia, 4 doentes apresentavam trombocitopenia ligeira, 5 doentes tinham trombocitopenia moderada, 8 doentes se apresentaram com trombocitopenia grave e 1 doente tinha trombocitopenia muito grave, de acordo com os critérios de CTCAE.

Procedemos também à avaliação do impacto da trombocitopenia na nossa amostra, utilizando o valor deste índice prognóstico constante no *score* DIPSS-*plus* (plaquetas < 100 G/L, tabela II). Com esta análise verificou-se que 39 doentes (70,9 %) apresentavam contagens de plaquetas superiores a esse valor, e 16 doentes (29,1 %) apresentavam contagens de plaquetas inferiores ao valor supra-mencionado. Observou-se que a sobrevivência global mediana foi de 44,3 meses em doentes com contagens de plaquetas > 100 G/L, sendo de apenas 7,3 meses em doentes com contagens inferiores a esse valor, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,0002$). (Figura 10)

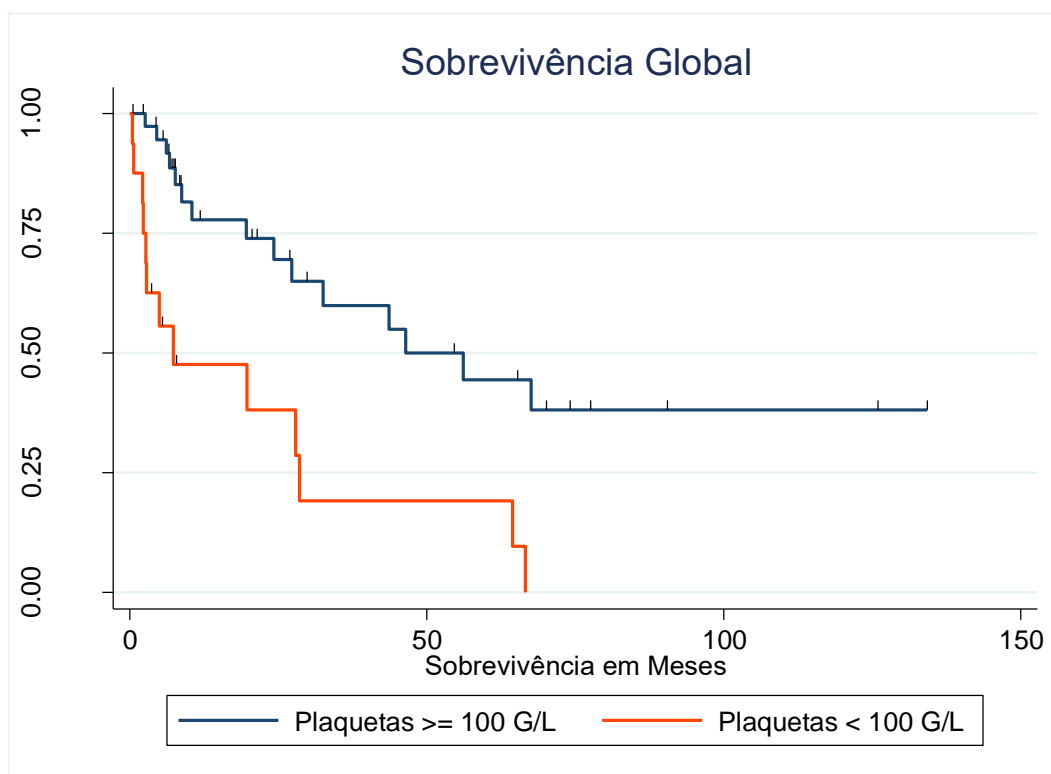


Figura 10 – Impacto da contagem de plaquetas na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com contagem de plaquetas ≥ 100 G/L e a curva a **vermelho** representa os doentes com contagem de plaquetas < 100 G/L. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas, $p=0,0002$

2.4 Avaliação dos valores de LDH nos doentes com MFP da nossa amostra

Para avaliar nos doentes da nossa série os valores de LDH, foram utilizados, para definir a normalidade, os valores de referência do hospital onde o estudo foi realizado, assim foram considerados como normais os valores da LDH até 220 U/L. Deste modo, observou-se, na nossa amostra, que no momento do diagnóstico da MFP 5 doentes (9,1%) apresentavam valores normais de LDH, e 50 doentes (90,9%) apresentavam este parâmetro elevado. Destes, 9 doentes (16,4% do total) tinham uma elevação da LDH $< 1,5$ vezes o limite superior de normalidade (LSN), 8 doentes (14,6% do total) apresentavam um incremento de LDH entre 1,5 e 2 vezes o LSN, 13 doentes (23,6%) tinham um aumento de LDH de 2 a 3 vezes o LSN, 17 doentes (30,9%

do total) apresentavam um aumento deste parâmetro de 3 a 5 vezes o LSN, e 3 doentes (5,5%) tinham um aumento de LDH superior a 5 vezes o LSN. (Figura 11)

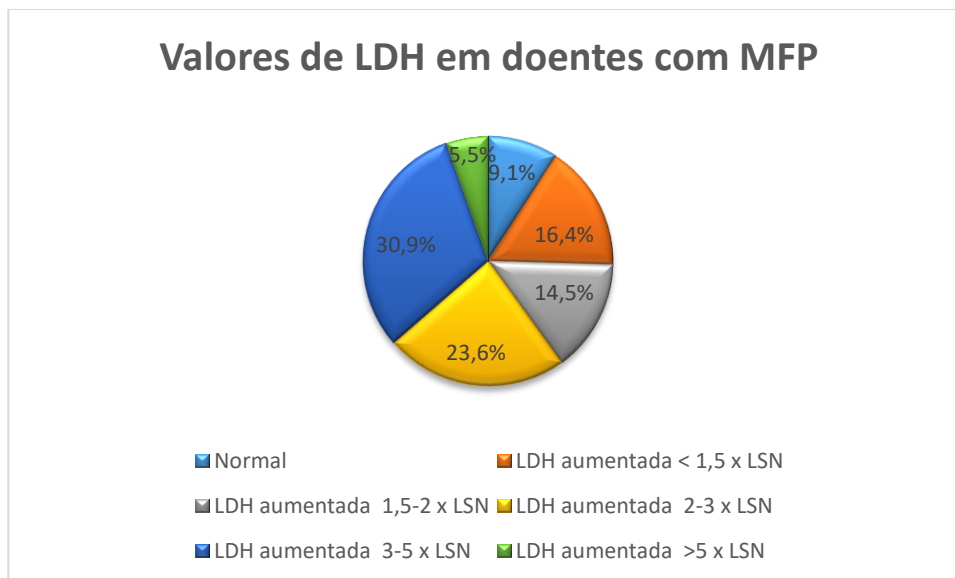


Figura 11 – Valor de LDH em doentes com MFP, quando do diagnóstico. 5 doentes apresentavam valor normal de LDH, 9 doentes tinham valores de LDH aumentados < 1,5 x LSN, 8 doentes apresentavam valores de LDH aumentados 1,5-2 x LSN, 13 doentes tinham valores de LDH aumentados 2-3 x LSN, 17 doentes se encontravam com os valores de LDH aumentados 3-5 x LSN e 3 doentes tinham valores de LDH aumentados > 5 x LSN. Para definir a normalidade dos valores de LDH utilizou-se o valor de referência do hospital onde o estudo foi realizado – até 220 U/L.

2.5 Impacto prognóstico das contagens de blastos no sangue periférico dos doentes com MFP da nossa amostra

Na avaliação dos valores de blastos no sangue periférico dos doentes na altura do diagnóstico da MFP, observou-se que em 50 doentes (90,9%) não foram observados blastos no sangue periférico, 4 doentes (7,3%) tinham uma blastémia inferior a 5% e 1 doente (1,8%) tinha 5 a 10% de blastos no sangue periférico. (Figura 12)

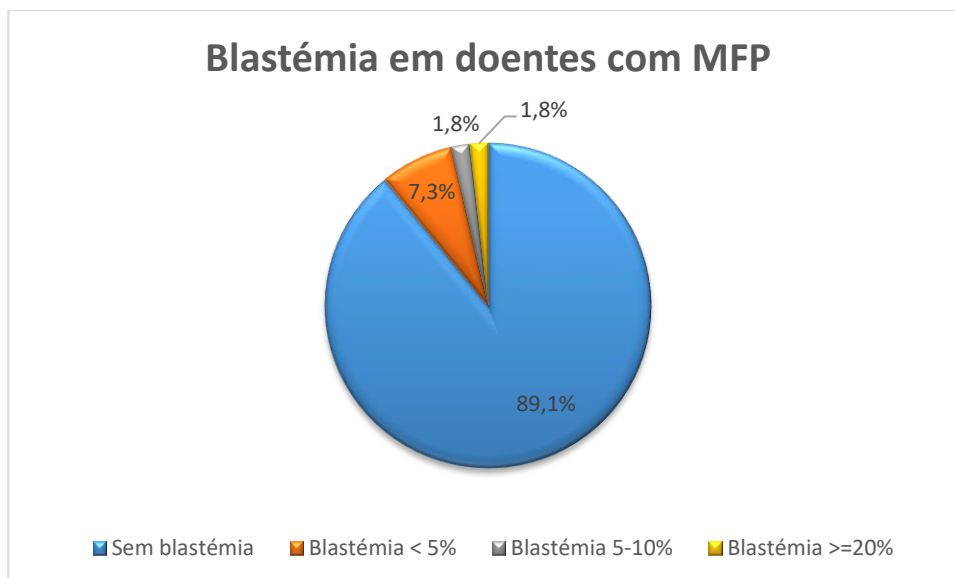


Figura 12 – Valor de blastos no sangue periférico dos doentes com MFP, quando do diagnóstico. 50 doentes não apresentavam blastos no sangue periférico, 4 doentes apresentavam um valor de blastémia <5% e 1 doente apresentou-se com valor blastémia situado entre 5-10%.

Para avaliar o impacto da blastémia na sobrevivência global dos doentes, utilizou-se o ponto de corte validado no IPSS, no DIPSS e no DIPSS-*plus* como tendo validade prognóstica nos doentes com MFP (blastos no sangue periférico $\geq 1\%$, tabela II), tendo-se observado que 49 doentes (89,1%) apresentavam um valor de blastémia inferior a esse limite e 6 doentes (10,9%) apresentavam um valor de blastémia $\geq 1\%$, ao diagnóstico. Observou-se uma sobrevivência global mediana de 43,6 meses em doentes que apresentavam valor de blastos no sangue periférico inferior a 1%, e uma sobrevivência global mediana de 8,7 meses, em doentes blastémia superior a esse valor de corte. (Figura 13) Não foi atingido o nível de significância estatística. (p=NS)

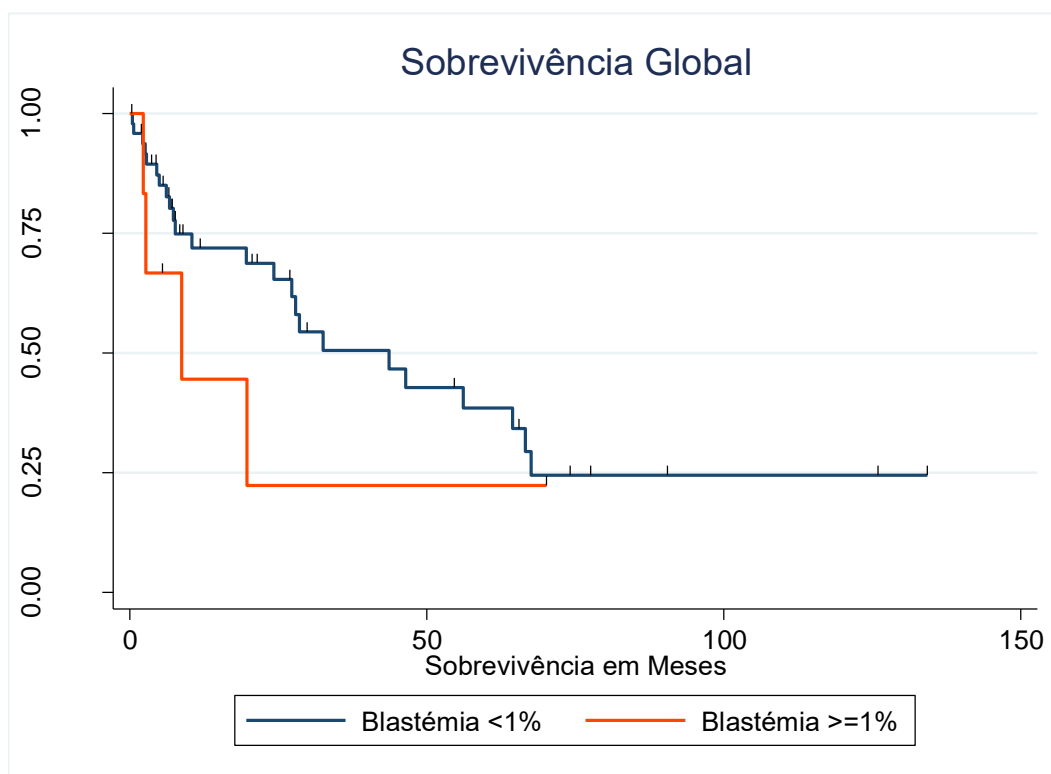


Figura 13 – Impacto das contagens de blastos na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com blastemia < 1% e a curva a **vermelho** representa os doentes com blastemia \geq 1%. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. As diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas.

2.6 Estratificação dos doentes com MFP estudados na nossa amostra segundo o *score* prognóstico DIPSS-*plus*

Considerando o intervalo de tempo estudado, que antecede a primeira descrição na literatura de algumas das três principais mutações genéticas associadas à MFP actualmente reconhecidas, apenas os doentes com diagnóstico mais recente tinham pesquisa das três; da mesma forma, apenas uma proporção minoritária de doentes tinha estudo cariotípico com número de metafases suficiente para confirmação ou exclusão de cariótipo desfavorável. Neste contexto, não obtivemos o número de doentes com estudo genético suficiente que permitisse obter uma coorte

de dimensão adequada para aplicação de testes estatísticos, após estratificação da amostra, segundo o DIPSS-*plus*.

Da mesma forma, e considerando as limitações intrínsecas do registo de sintomatologia subjectiva em processo clínico (onde a ausência de registo de um sintoma não poderá ser assumida como equivalente à ausência desse mesmo sintoma), não nos foi possível obter informação suficiente e objectiva sobre a presença de sintomas constitucionais, invalidando o cálculo do IPSS, do DIPSS e do DIPSS-*plus* para a nossa coorte.

Da mesma forma, devido às diferentes formas de avaliação de esplenomegália encontradas nos registos clínicos (incluindo: centímetros de baço palpáveis abaixo do rebordo costal, número de dedos abaixo do rebordo costal, comprimento estimado ecográfico, e comprimento estimado por tomografia computadorizada) com muito diferentes sensibilidades para detecção de aumento do baço, não foi possível realizar uma avaliação comparativa dos doentes relativamente à presença ou ausência deste sinal.

Pelas razões supracitadas não foi possível estratificar a amostra em termos de parâmetros prognósticos já existentes, nem relacionar os nossos resultados com os índices prognósticos actualmente utilizados.

3. Sobrevivência Global da amostra

Na amostra estudada, e após uma mediana de follow-up de 54,4 meses, a sobrevivência global mediana após o diagnóstico de MFP foi de 32,5 meses. Deste modo, ao fim de 24 meses 63,1% dos doentes estavam vivos, e ao fim de 48 meses já só estavam vivos 40,5% doentes. (Figura 14)

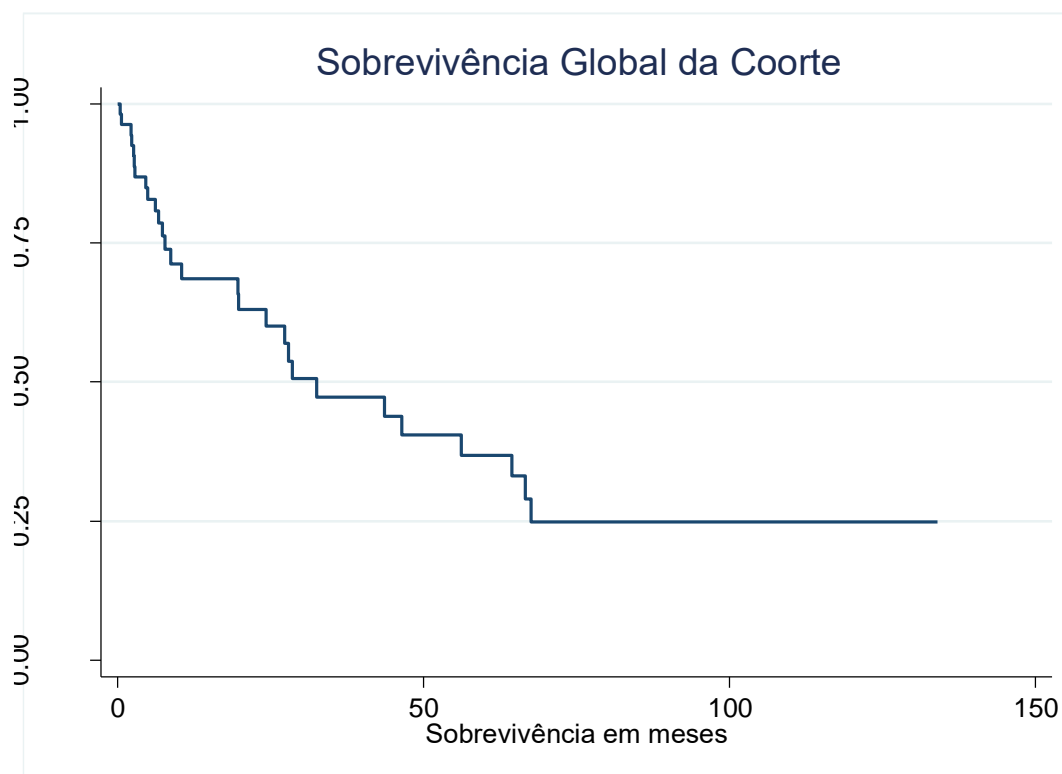


Figura 14 – Sobrevivência global dos doentes com MFP da nossa amostra.

4. Sobrevivência Livre de Progressão

Relativamente à pesquisa de blastémia circulante, 36 doentes (65,5%) tinham hemograma realizado no intervalo de três meses antes do UCM; destes, 23 doentes (41,8%) apresentavam valores analíticos no mês anterior UCM, sendo que 17 doentes (30,9%) tinham hemograma realizado menos de 10 dias antes da data do UCM ou da morte, e 11 doentes (20%) menos de 3 dias antes.

À data do UCM, apenas dois doentes (3,6%) tinham critérios no sangue periférico de progressão para LMA. Dos restantes doentes, 5 (9,1%) tinham reavaliação medular realizada no intervalo de 3 meses antes do UCM (e um destes tinha avaliação no mês anterior ao UCM), sem evidência de progressão. Considerando a muito baixa taxa de evidência periférica de progressão, e tendo em conta que 87,3% dos doentes não tinham avaliação medular que pudesse afirmar ou negar a progressão da doença à data do UCM ou da morte, a nossa coorte não permite fazer uma avaliação

do impacto das alterações citológicas sobre a sobrevivência livre de progressão, nem diferenciá-la de forma útil da sobrevivência global, ao contrário do que inicialmente tínhamos proposto realizar.

B. Influência da monocitose, eosinofilia e basofilia no prognóstico dos doentes com MFP

5. Influência prognóstica da monocitose nos doentes com MFP

5.1. Análise descritiva dos doentes com monocitose

Após análise de processos clínicos e exclusão das causas de monocitose reactiva, foram identificados 11 doentes que apresentavam monocitose absoluta aquando do diagnóstico de MFP (o que representa 20% da amostra), sendo 9 do género masculino (81,1%). (Figura 15) Não se observou qualquer associação significativa entre os parâmetros género e presença de monocitose ($p=NS$).

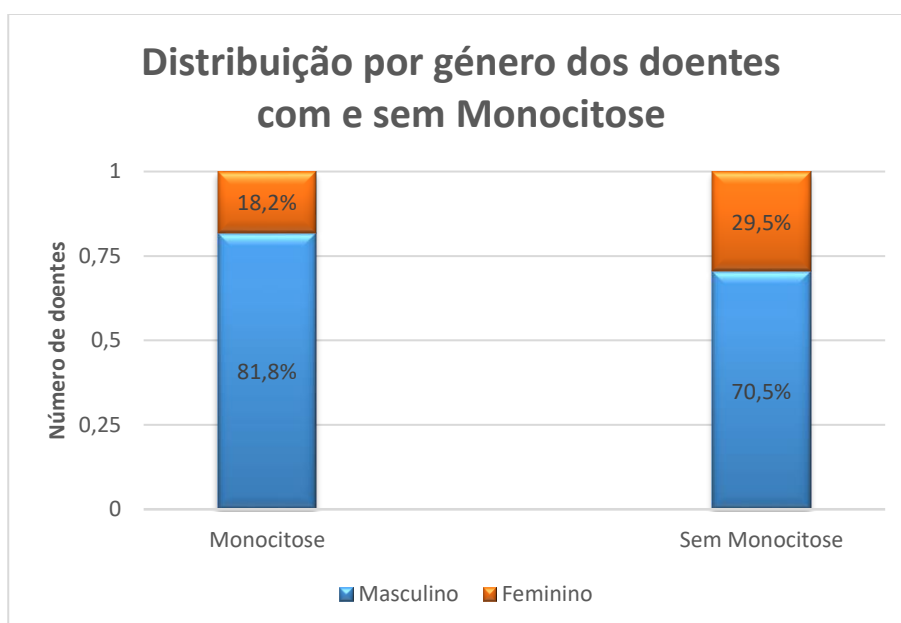


Figura 15 – Distribuição por género dos doentes com MFP de acordo com a presença e ausência de monocitose ao diagnóstico. Dos 11 doentes que se apresentaram com monocitose, 2 eram do género feminino e 9 do masculino.

Aquando do diagnóstico de MFP, os doentes com monocitose absoluta apresentavam uma idade média de $70,7 \pm 11,4$ anos, enquanto os doentes sem monocitose apresentavam uma idade

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

média de $69,9 \pm 11,9$ anos, não se tendo observado relação significativa entre estes parâmetros ($p=NS$). (Figura 16)

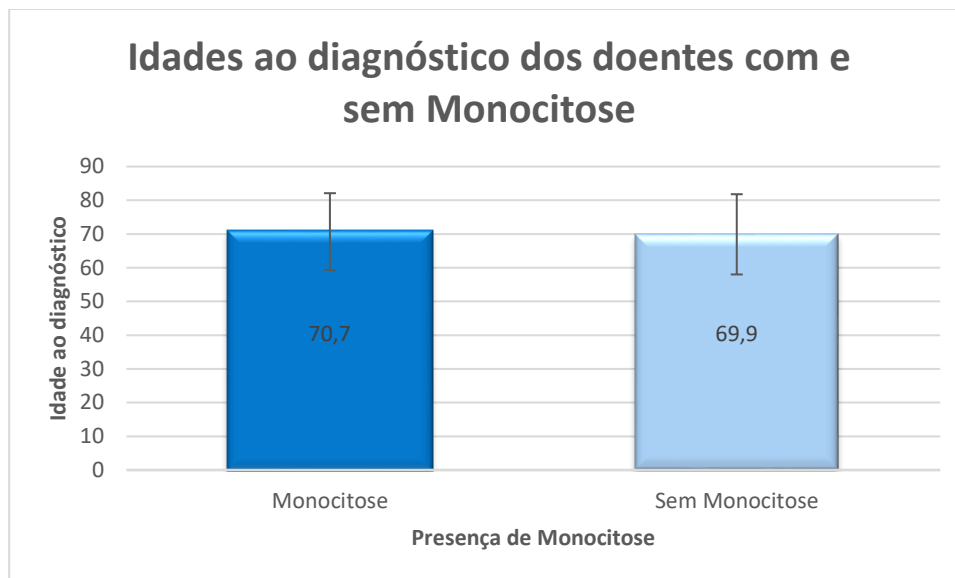


Figura 16 – Distribuição da média das idades dos doentes com e sem monocitose ao diagnóstico de MFP.

5.2. Influência da monocitose na sobrevivência global dos doentes com MFP

Em doentes que apresentavam monocitose quando do diagnóstico de MFP, observou-se uma sobrevivência mediana de 27,3 meses, comparativamente a doentes sem monocitose ao diagnóstico, em que a sobrevivência global mediana foi de 46,4 meses, não sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p=NS$). (Figura 17) No entanto, a sobrevivência global aos 12 meses foi inferior nos indivíduos que não apresentavam monocitose ao diagnóstico (67,6%) em comparação com os que apresentavam (71,6%), invertendo-se esta relação a partir dos 24 meses (sobrevivência de 64% dos doentes sem monocitose versus 59,7% dos doentes com monocitose, $p=NS$). As curvas de análise de sobrevivência sugerem que a monocitose absoluta, a longo prazo, se relaciona com uma redução na sobrevivência global dos doentes com MFP. (Figura 17)

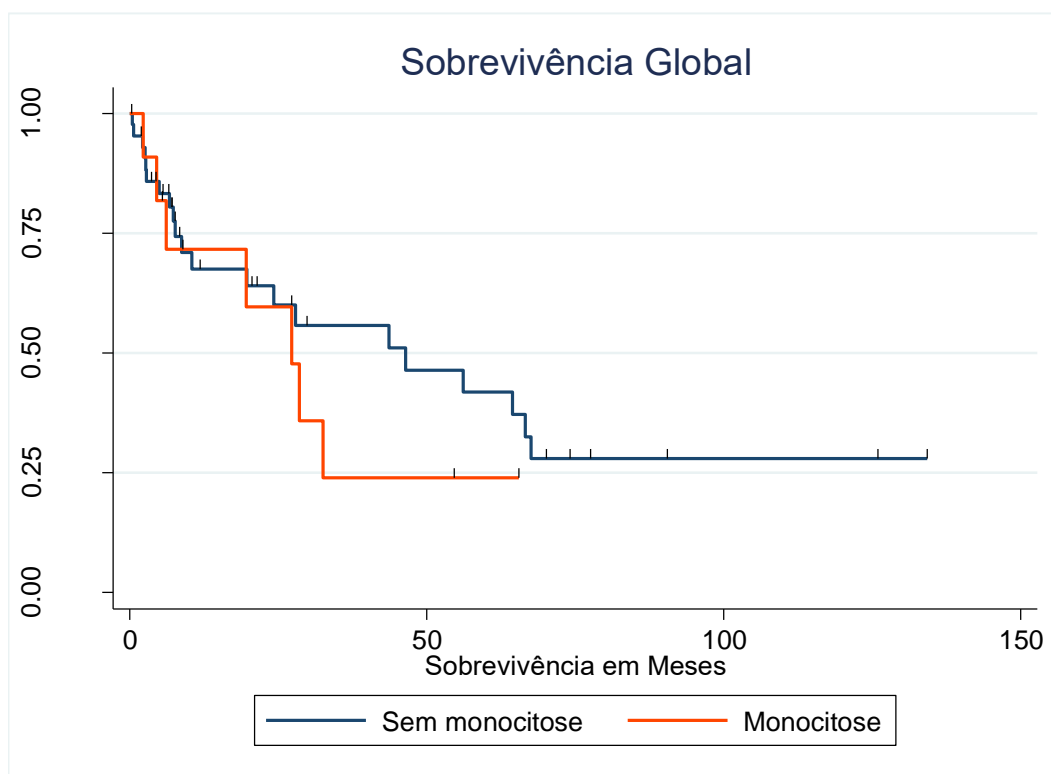


Figura 17 – Impacto da monocitose na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com contagens normais dos monócitos e a curva a **vermelho** representa os doentes com contagem de monócitos $> 1 \times 10^9/L$. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. O nível de significância para a diferença encontrada entre as curvas não foi atingido.

Posteriormente efectuámos o cálculo de um novo valor de corte (*cut-off*) para a contagem dos monócitos de modo a obter um valor que nesta série melhor discriminaria os doentes em termos de probabilidade de sobrevivência, obtendo-se o valor de $0,75 \times 10^9$ monócitos/L, com uma especificidade de 74,1% (intervalo de confiança a 95%: 53,7% - 88,9%) e sensibilidade de 39,3% (intervalo de confiança a 95%: 21,5% - 59,9%).

De acordo com o novo *cut-off* foram identificados 18 doentes com valores de monócitos ao diagnóstico superiores a $0,75 \times 10^9/L$. Observou-se uma sobrevivência global mediana de 64,4 meses em indivíduos sem monocitose, e 27,9 meses em doentes com monocitose ao diagnóstico de acordo com o novo *cut-off*. (Figura 18) Aos 12 meses, 62,1% de doentes sem monocitose encontravam-se vivos, comparativamente a 82,2% dos doentes com monocitose; aos 24 meses

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

mantinham-se vivos 62,1% dos doentes sem monocitose, com uma redução para 65,8% da sobrevivência de doentes com monocitose ao diagnóstico, observando-se uma inversão e separação das curvas a partir dos 28 meses de seguimento. Estes resultados não apresentaram significância estatística ($p=NS$).

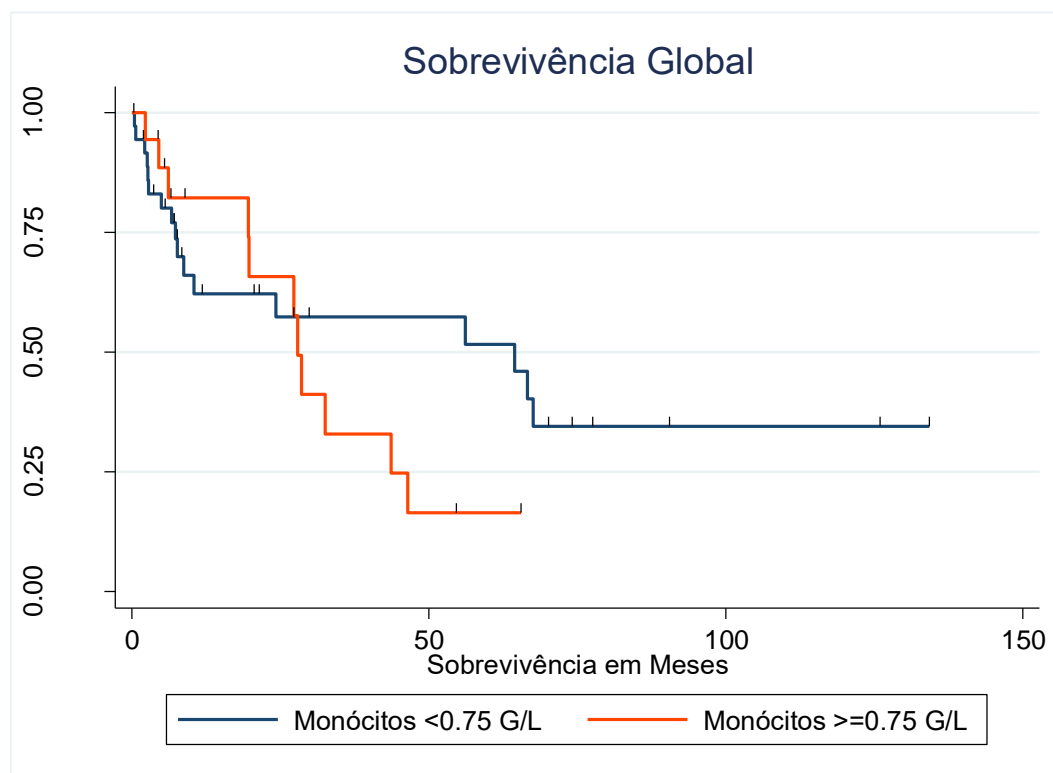


Figura 18 – Impacto do valor de monócitos do novo *cut-off* na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com contagens normais dos monócitos e a curva a **vermelho** representa os doentes com contagem de monócitos $> 0,75 \times 10^9 /L$ (valor do novo *cut-off*). A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. O nível de significância para a diferença encontrada entre as curvas não foi atingido.

6. Influência prognóstica da eosinofilia nos doentes com MFP

6.1. Análise descritiva dos doentes com eosinofilia

Da análise dos processos dos doentes com o diagnóstico de MFP, 7 dos 55 doentes analisados apresentavam eosinofilia à data do diagnóstico (12,7% da amostra), sendo 5 do género masculino. (Figura 19) A média de idades ao diagnóstico dos doentes com eosinofilia era de $74,7 \pm 11,9$ anos, enquanto os doentes com MFP que não apresentavam eosinofilia foram diagnosticados em média aos $69,4 \pm 11,6$ anos de idade, $p=NS$. (Figura 20) Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos valores e variáveis supracitadas.

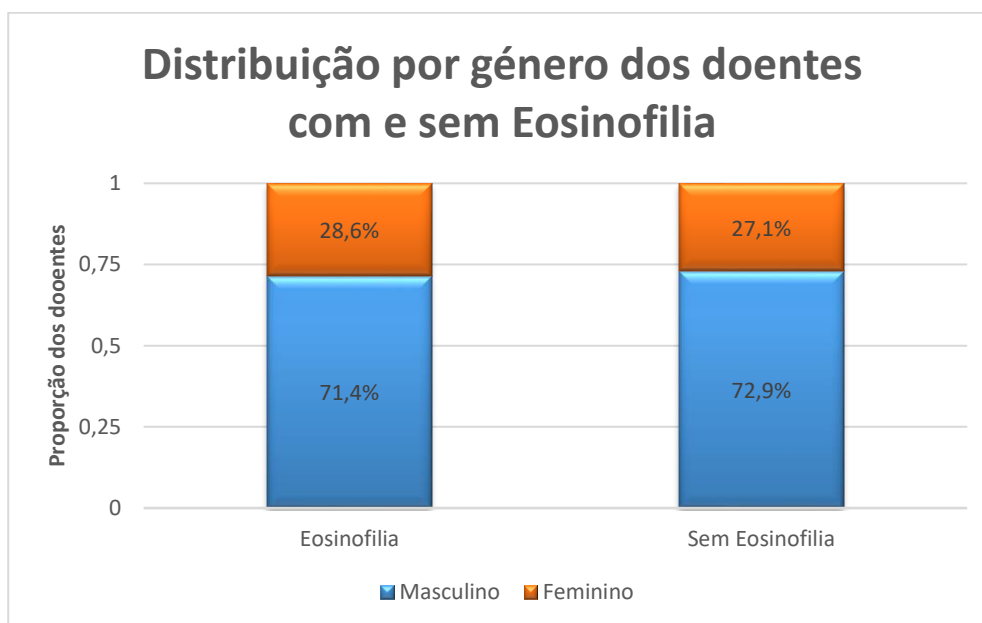


Figura 19 – Distribuição por género dos doentes com MFP de acordo com a presença e ausência de eosinofilia ao diagnóstico. Dos 7 doentes que apresentaram eosinofilia, 2 eram do género feminino e 5 do masculino.

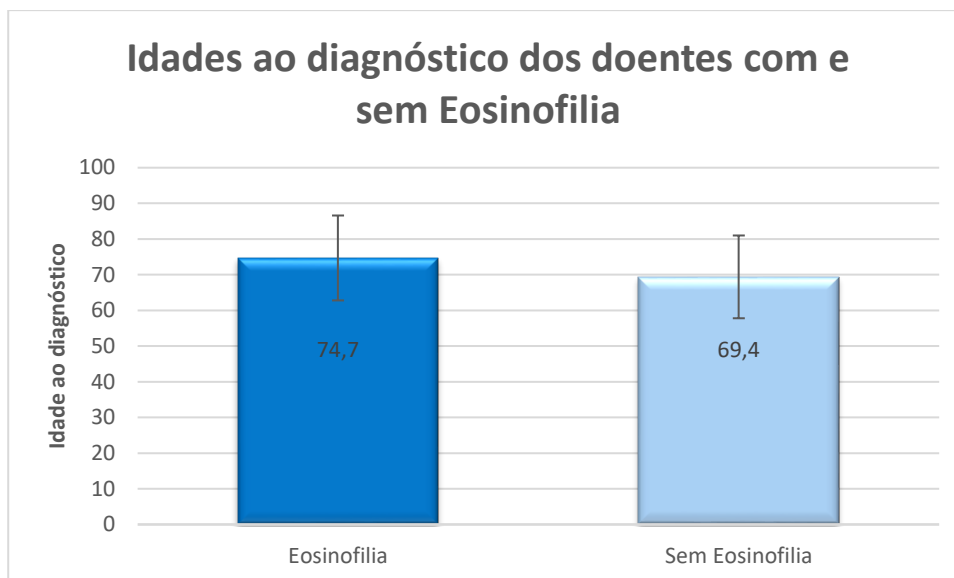


Figura 20 – Idade média dos doentes com MFP ao diagnóstico com e sem eosinofilia.

6.2. Influência da eosinofilia na sobrevivência global dos doentes com MFP

A sobrevivência global mediana dos doentes com eosinofilia ao diagnóstico foi de 6,1 meses, sendo de 32,5 meses nos doentes com valores normais de eosinófilos no sangue periférico. Assim, 12 meses após o diagnóstico de MFP, estavam vivos 70,9% dos doentes sem eosinofilia e 50% dos doentes que apresentavam eosinofilia no momento do diagnóstico (figura 21), não se tendo atingido significância estatística. (p=NS)

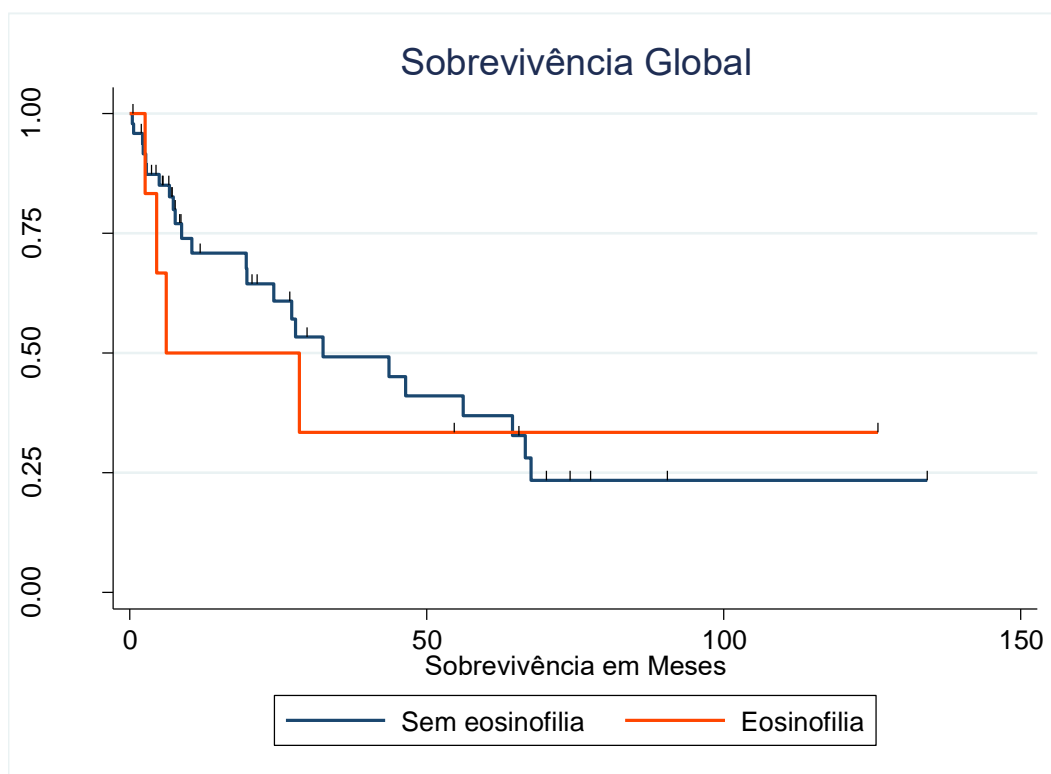


Figura 21 – Impacto da eosinofilia na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com contagens normais dos eosinófilos e a **curva a vermelho** representa os doentes com contagem de eosinófilos $> 0,6 \times 10^9 /L$. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. O nível de significância para a diferença encontrada entre as curvas não foi atingido.

Foi determinado um novo valor de corte para a eosinofilia, de modo a diferenciar melhor os doentes em termos de sobrevivência, nesta série, obtendo-se o valor de $0,25 \times 10^9$ eosinófilos/L, com uma especificidade de 77,8% (intervalo de confiança a 95%: 57,7% - 91,4%) e sensibilidade de 35,7% (intervalo de confiança a 95%: 18,6% - 55,9%).

De acordo com o novo *cut-off*, 16 doentes apresentavam eosinofilia (29,1%), com uma sobrevivência global mediana de 27,3 meses, enquanto os doentes com valor de eosinófilos inferior ao *cut-off* tinham uma mediana de sobrevivência global de 43,6 meses (figura 22), sendo que, aos 12 meses após o diagnóstico de MFP, 70,5% dos doentes sem eosinofilia estavam vivos (versus 70,8% obtidos antes do cálculo do novo *cut-off*), assim como 65,2% dos doentes com eosinofilia ao diagnóstico (versus 50% obtidos tendo em conta o valor de eosinofilia inicialmente estabelecido).

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

Contrariamente ao verificado com o *cut-off* inicial, não houve cruzamento das curvas com o novo *cut-off*, mantendo-se os doentes sem eosinofilia sempre com taxas de sobrevivência superiores; no entanto, estes resultados não apresentaram significância estatística. (P=NS)

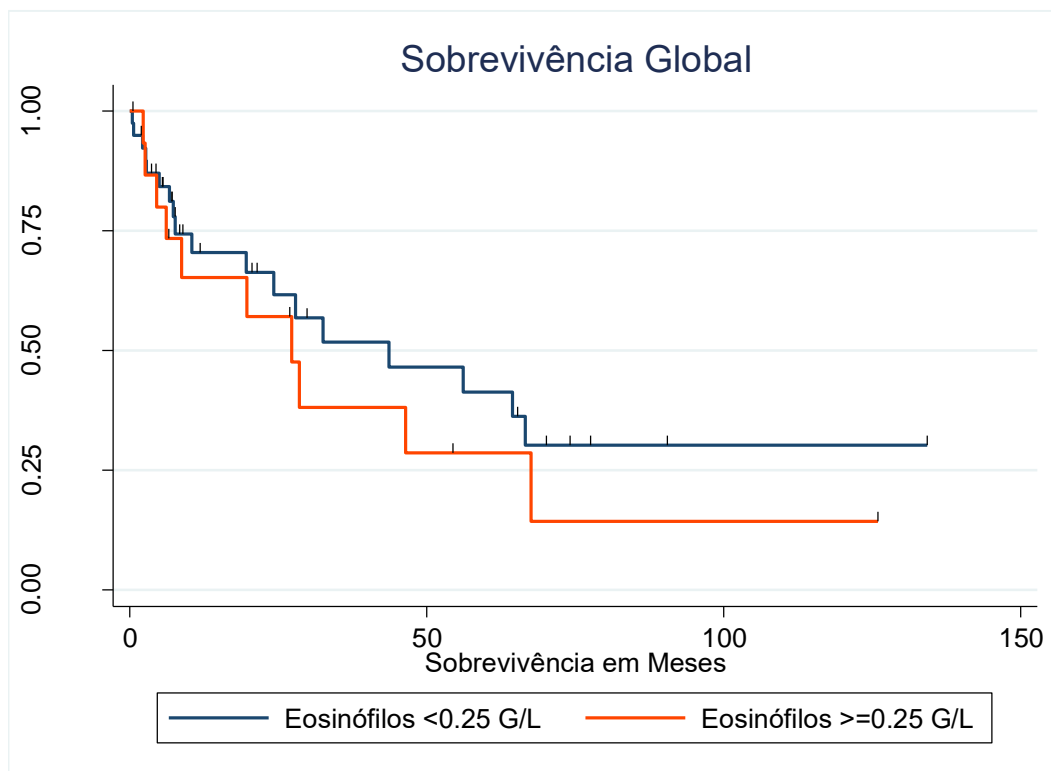


Figura 22 – Impacto do valor de eosinófilos do novo *cut-off* na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com contagens normais dos eosinófilos e a curva a **vermelho** representa os doentes com contagem de eosinófilos $> 0,25 \times 10^9/L$ (valor do novo *cut-off*). A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. O nível de significância estatística para a diferença encontrada entre as curvas não foi atingido.

7. Influência prognóstica da basofilia nos doentes com MFP

7.1. Análise descritiva dos doentes com basofilia

Na amostra estudada, 17 doentes apresentavam basofilia na altura do diagnóstico de MFP (30,9% dos doentes), 14 dos quais eram do género masculino (figura 23). Entre os doentes com basofilia, a idade média do diagnóstico da doença foi de $73,6 \pm 11,2$ anos, e nos doentes sem basofilia $68,5 \pm 11,7$ anos, $p=NS$, não sendo estas diferenças estatisticamente significativas. (Figura 24)

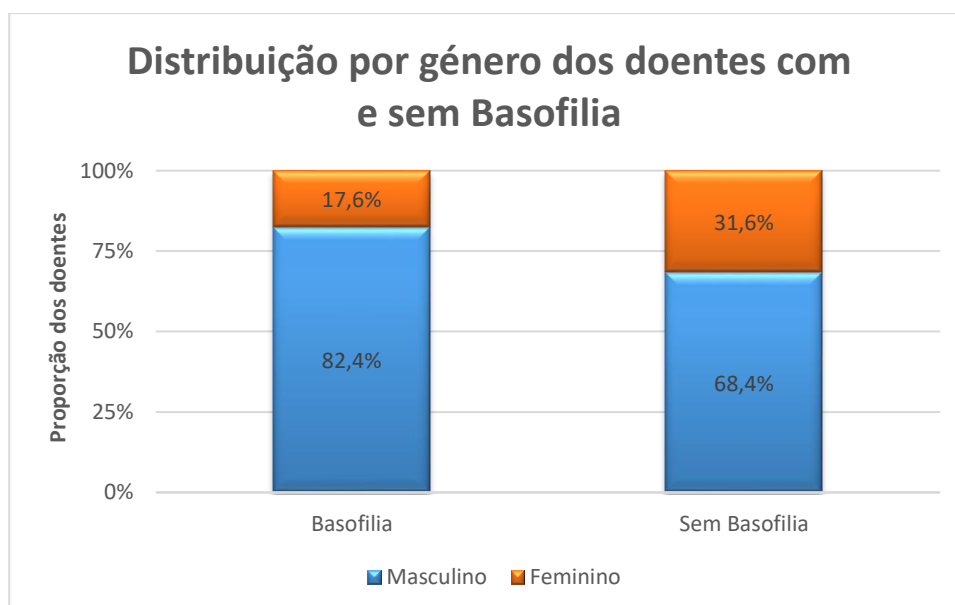


Figura 23 – Distribuição por género dos doentes com MFP de acordo com a presença e ausência de basofilia ao diagnóstico. Dos 17 doentes que apresentaram basofilia, 3 eram do género feminino e 14 do masculino.

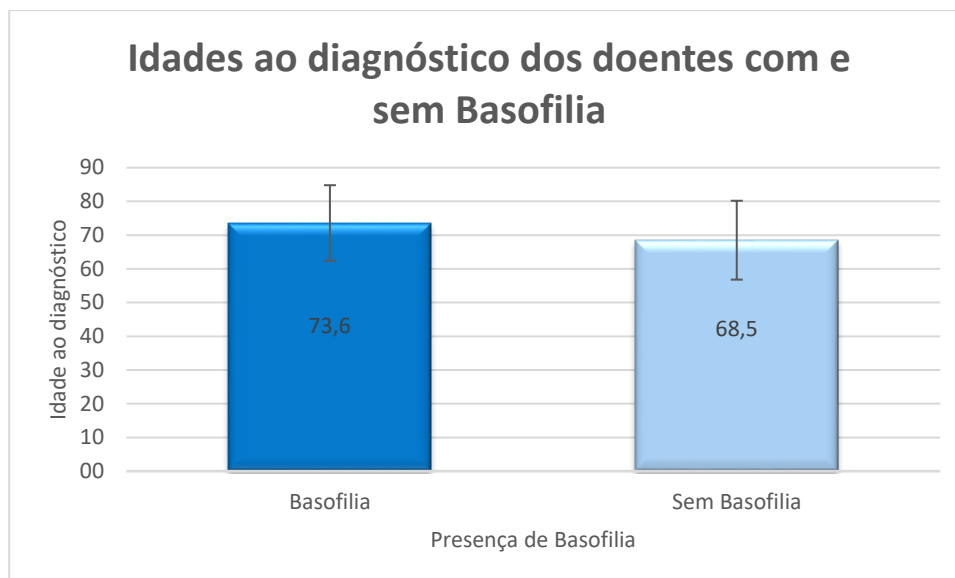


Figura 24 – Distribuição da média das idades dos doentes com e sem basofilia ao diagnóstico de MFP.

7.2. Influência da basofilia na sobrevivência global dos doentes com MFP

A sobrevivência global mediana dos doentes que apresentaram basofilia quando do diagnóstico foi de 25,6 meses, enquanto os doentes sem basofilia apresentaram uma sobrevivência global mediana de 32,5 meses. (Figura 25) Aos 12 meses após o diagnóstico, 73,4% dos doentes com basofilia e 67,4% dos doentes sem basofilia encontravam-se vivos, sendo esta relação inversa a partir dos 24 meses após o diagnóstico, estando vivos 62,9% e 63,6% dos doentes com e sem basofilia ao diagnóstico, respectivamente. Não se atingiu, no entanto, a significância estatística. (p=NS)

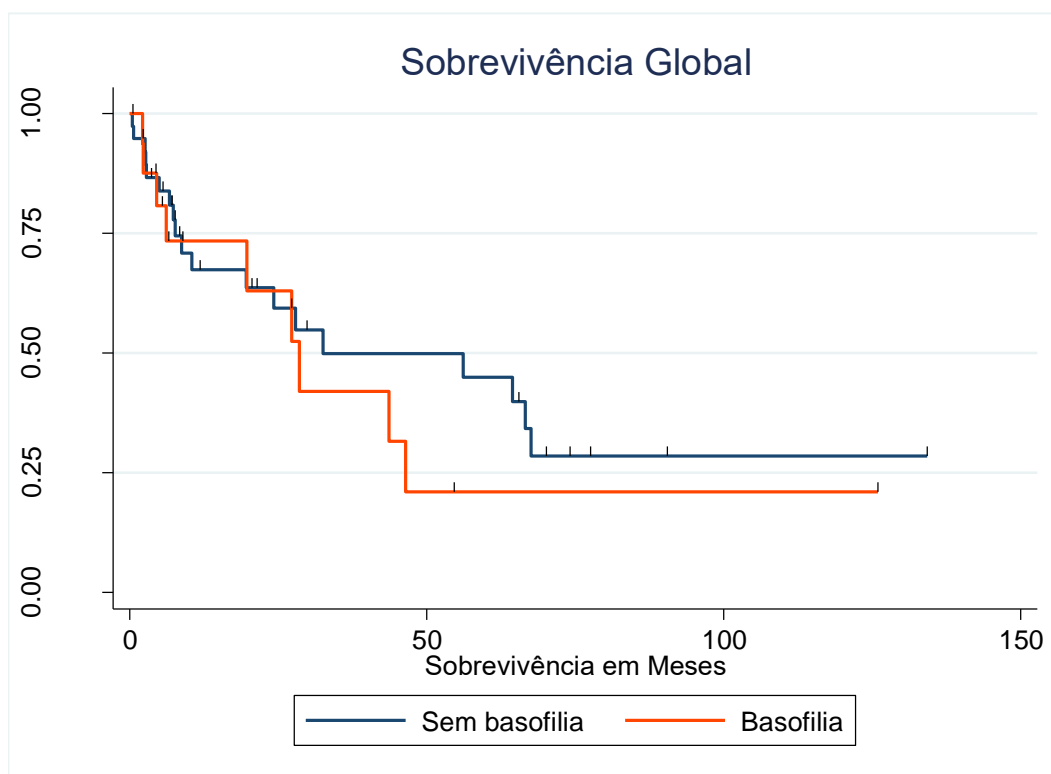


Figura 25 – Impacto da basofilia na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com contagens normais dos basófilos e a curva a **vermelho** representa os doentes com contagem de basófilos $> 0,2 \times 10^9 /L$. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. O nível de significância estatística para a diferença encontrada entre as curvas não foi atingido.

Foi feito o cálculo de um novo *cut-off* para a basofilia, de modo a melhor distinguir os doentes desta série, em termos de sobrevivência, obtendo-se um valor de $0,25 \times 10^9$ basófilos/L, com uma especificidade de 88,9% (intervalo de confiança a 95%: 70,8% - 97,6%) e sensibilidade de 28,6% (intervalo de confiança a 95%: 13,2% - 48,7%).

Considerando o novo *cut-off*, 11 doentes da amostra apresentavam basofilia aquando do diagnóstico de MFP, sendo a sobrevivência global mediana destes doentes de 19,7 meses, enquanto a dos indivíduos com contagens dos basófilos inferiores ao novo *cut-off* obtido foi de 46,4 meses. (Figura 26) Assim, 12 meses após o diagnóstico, 57,1% dos doentes com e 70,7% dos doentes sem basofilia estavam vivos, persistindo um afastamento progressivo das curvas já verificado aos 24 meses com 45,7% dos doentes com basofilia e 67,2% dos doentes sem basofilia vivos. Estes achados

apresentaram uma significância estatística limítrofe ($p=0,06$). Observou-se, assim, uma relação directa entre o número de basófilos ao diagnóstico e a redução da sobrevivência global dos doentes com MFP.

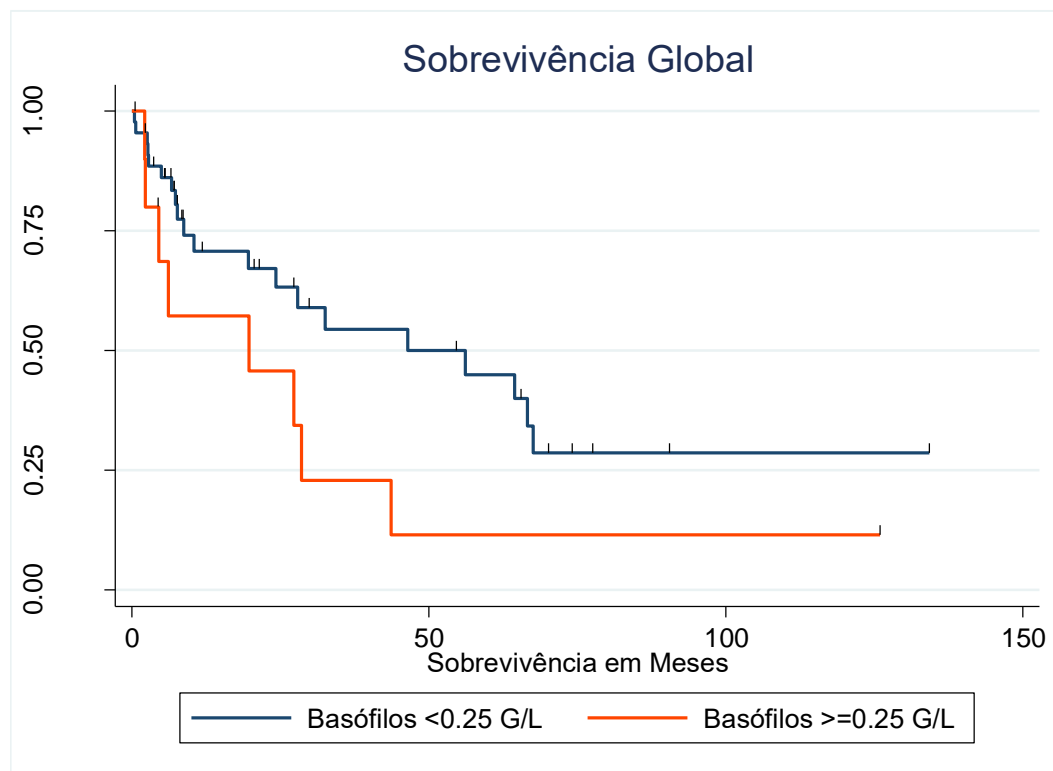


Figura 26 – Impacto do valor de basófilos do novo *cut-off* na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a **azul** representa os doentes com contagens normais dos basófilos e a curva a **vermelho** representa os doentes com contagem de basófilos $> 0,25 \times 10^9 /L$ (valor do novo *cut-off*). A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier e a significância para a diferença encontrada entre as curvas foi limítrofe ($p=0,06$).

8. Alteração em pelo menos um parâmetro

Ao analisar todos os doentes, observou-se que 34 doentes (61,8%) não apresentavam alteração em nenhum dos parâmetros prognósticos em estudo, 11 (20%) tinham elevação de um parâmetro isoladamente, com predomínio da basofilia isolada, 2 apresentavam eosinofilia e basofilia (3,6%),

AValiação da influência das contagens de basófilos, eosinófilos e monócitos no prognóstico da mielofibrose primária

4 apresentavam basofilia e monocitose (7,3%) e 4 apresentaram elevação simultaneamente nos três parâmetros estudados (7,3%). (Figura 27)

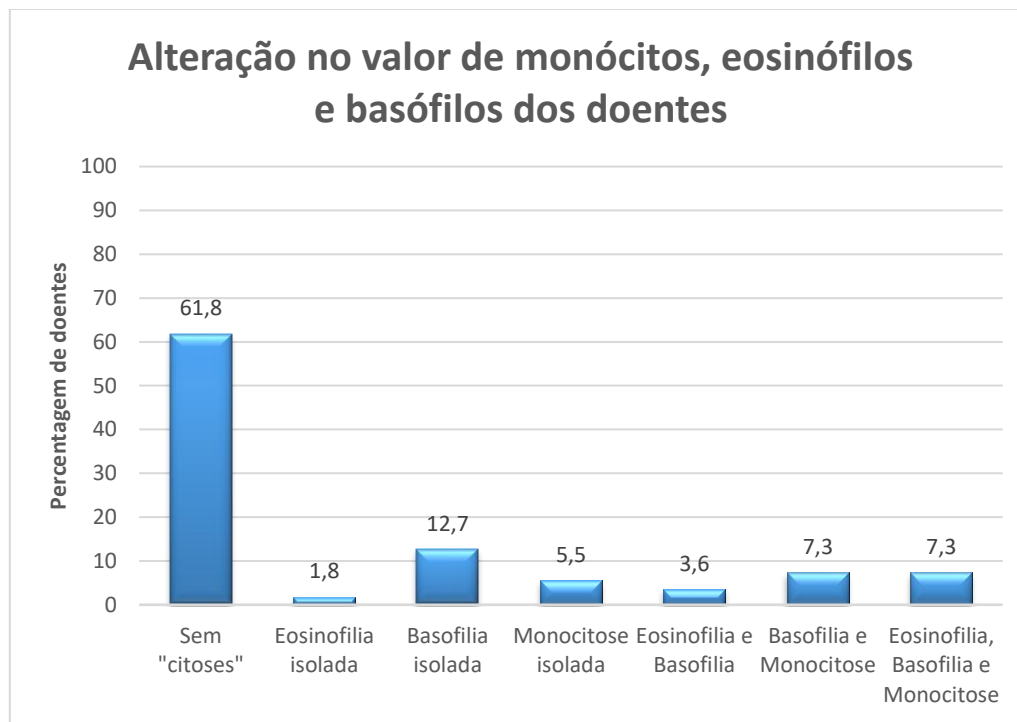


Figura 27 – Alteração nos parâmetros analíticos dos doentes em estudo. “Sem citoses”, neste contexto, é utilizado para significar que o valor dos eosinófilos, basófilos e monócitos não se encontrava aumentado, não excluindo neutrofilia, linfocitose, eritrocitose ou trombocitose. Eosinofilia: valor dos eosinófilos $> 0,6 \times 10^9 /L$. Basofilia: basófilos $> 0,2 \times 10^9 /L$. Monocitose: monócitos $> 1 \times 10^9 /L$

8.1. Influência da alteração de pelo menos um parâmetro analítico na sobrevivência global

A sobrevivência global mediana dos doentes que apresentaram, aquando do diagnóstico, alterações em mais do que um dos parâmetros prognósticos avaliados foi de 28,5 meses, enquanto os doentes com valores normais dos parâmetros analíticos apresentaram uma sobrevivência global mediana de 56,1 meses. (Figura 28) Não se atingiu, no entanto, a significância estatística. (p=NS)

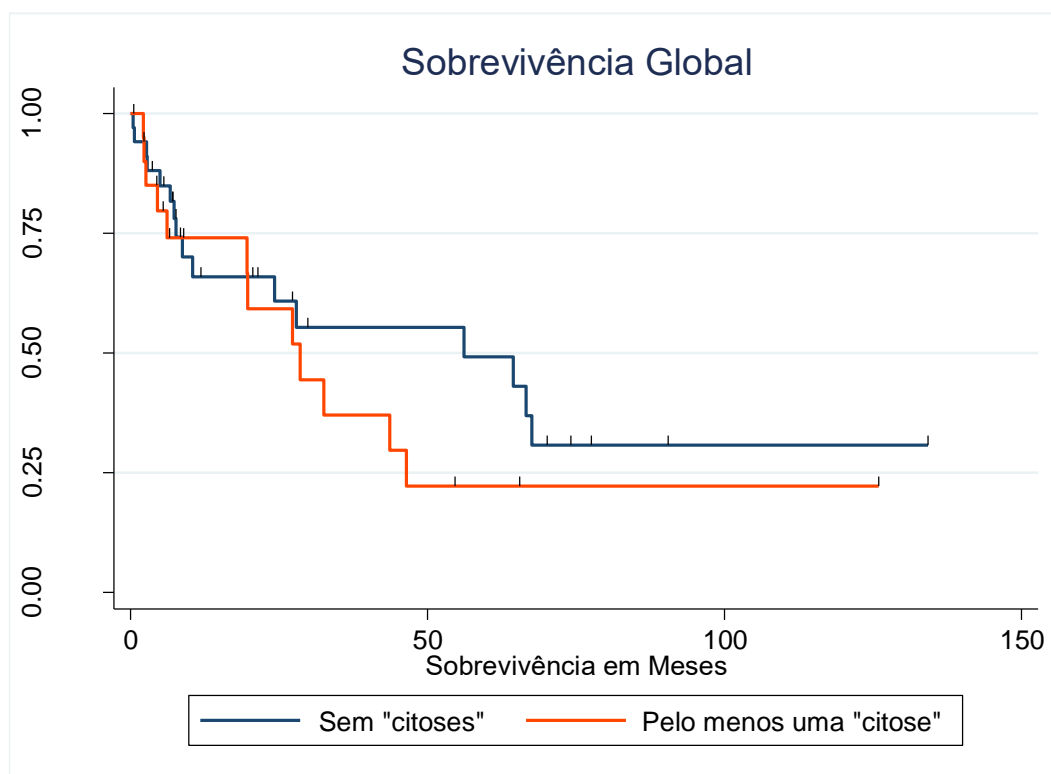


Figura 28 – Impacto da presença da alteração em pelo menos um parâmetro prognóstico na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a azul representa os doentes com contagens analíticas normais e a curva a vermelho representa os doentes com alteração de pelo menos um dos parâmetros em estudo. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. O nível de significância estatística para a diferença encontrada entre as curvas não foi atingido.

Utilizando os novos *cut-offs* obtidos para cada parâmetro em estudo (monócitos $> 0,75 \times 10^9$ /L, eosinófilos $> 0,25 \times 10^9$ /L e basófilos $> 0,25 \times 10^9$ /L), a sobrevivência global mediana dos doentes que apresentaram, aquando do diagnóstico, alterações em pelo menos um dos parâmetros prognósticos avaliados foi de 27,9 meses, enquanto os doentes sem alterações nos parâmetros analíticos estudados, mostraram uma sobrevivência global mediana de 64,4 meses. (Figura 29) Não se atingiu, no entanto, a significância estatística. ($p=NS$)

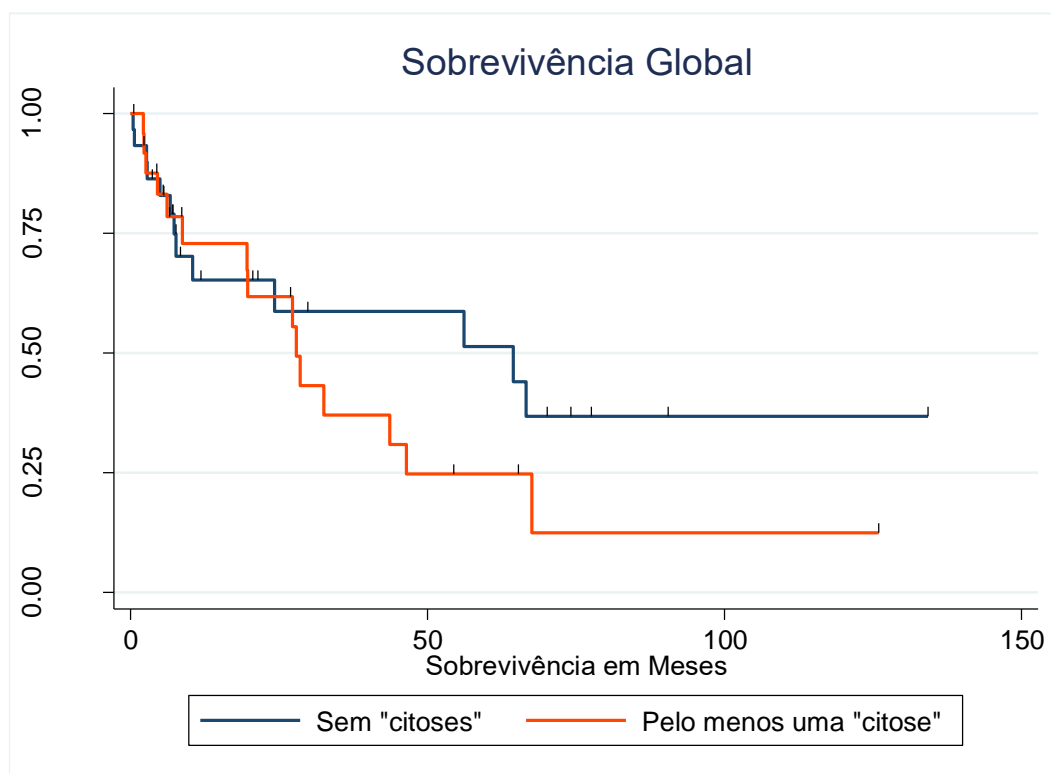


Figura 29 – Impacto da presença da alteração em pelo menos um parâmetro prognóstico, de acordo com os novos *cut-offs*, na sobrevivência global dos doentes com MFP. A curva a azul representa os doentes com contagens analíticas normais e a curva a vermelho representa os doentes com alteração de pelo menos um dos parâmetros em estudo, de acordo com os novos *cut-offs*. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. O nível de significância estatística para a diferença encontrada entre as curvas não foi atingido.

9. Tratamento com ruxolitinib

9.1. Influência do tratamento com ruxolitinib na sobrevivência global dos doentes com MFP

Dos 55 doentes incluídos neste estudo, 11 foram submetidos a terapêutica com ruxolitinib, com uma mediana de follow-up desde o início do fármaco de 14,1 meses.

Entre os doentes tratados com ruxolitinib a mediana da sobrevivência global não foi atingida, sendo que ao fim de 24 meses 79,6% dos doentes encontravam-se vivos, e aos 48 meses 66,3% ainda estavam vivos. (Figura 30) Nos doentes que não fizeram tratamento com ruxolitinib, a

mediana de sobrevivência global foi de 28,6 meses, com apenas 33,5% vivos aos 48 meses (p=0.028).

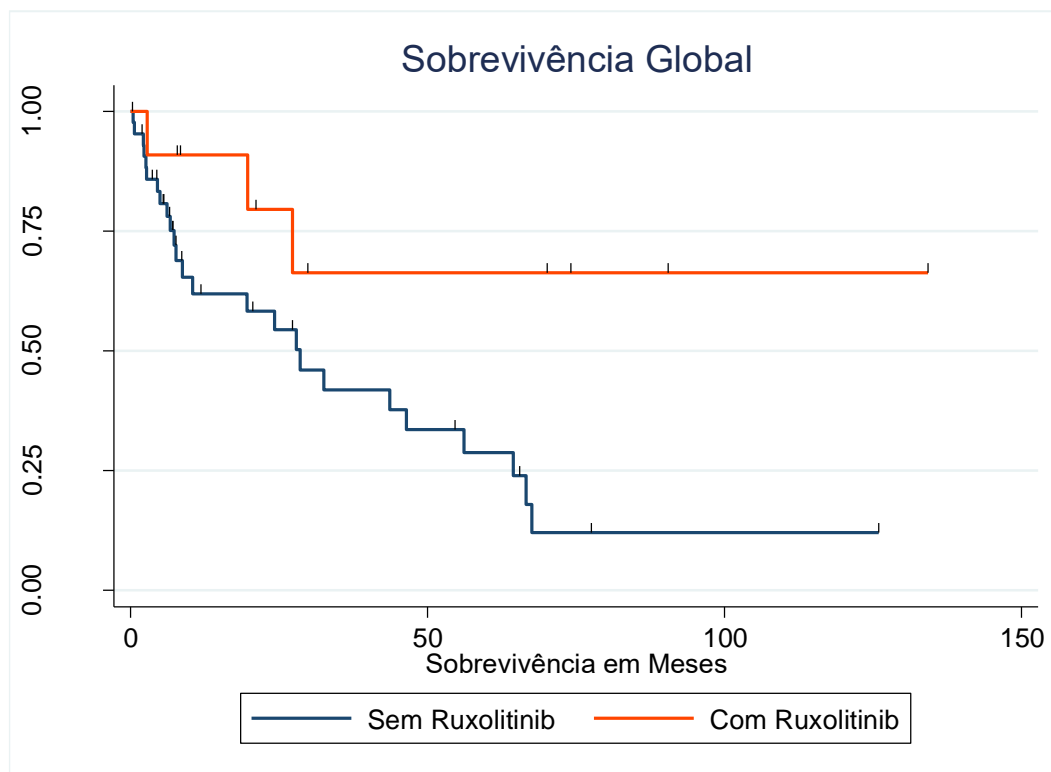


Figura 30 – Impacto do tratamento com ruxolitinib na sobrevivência global dos doentes. A curva a **azul** representa os doentes não submetidos ao tratamento com ruxolitinib e a curva a **vermelho** representa os doentes tratados com ruxolitinib. A probabilidade de sobrevivência global foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas, p=0,028.

9.2. Monocitose e tratamento com ruxolitinib

Entre os doentes tratados com ruxolitinib apenas um doente apresentava monocitose ao diagnóstico de MFP. Entre os doentes tratados com ruxolitinib, observou-se que o tempo médio de tratamento foi de $11,7 \pm 3$ meses nos que não apresentavam monocitose e de apenas 1,8 meses no doente que se acompanhou de monocitose ao diagnóstico. No que respeita à sobrevivência global desde o início de ruxolitinib, observou-se que dos indivíduos que não apresentavam monocitose ao diagnóstico 77% estavam vivos ao fim de 12 meses, enquanto o doente que desenvolveu monocitose

faleceu aos 1,8 meses de tratamento. Quanto à mediana de sobrevivência esta não foi alcançada nos doentes sem monocitose. (p=0,05)

Após o cálculo do novo *cut-off*, 2 doentes apresentavam valor de monocitose superior a $0,75 \times 10^9$ /L. Nos doentes sem monocitose, não foi alcançada a mediana da sobrevivência global, enquanto os 2 doentes com monocitose faleceram aos 1,8 e 6,8 meses após o início de tratamento. Ao fim de 12 meses após o início do tratamento, estavam vivos 88,9% dos doentes sem monocitose. (p=0,05)

9.3. Eosinofilia e tratamento com ruxolitinib

Dos 11 doentes a que foi administrado ruxolitinib, nenhum apresentava eosinofilia à data do diagnóstico de MFP, quando utilizado o valor de corte de eosinófilos $> 0,6 \times 10^9$ /L. Nos doentes tratados com ruxolitinib (e que não apresentavam eosinofilia) a sobrevivência global ao fim de 12 meses de tratamento foi de 70,1%.

Utilizando o novo *cut-off* calculado, 2 doentes com eosinofilia, (figura 31) apresentavam uma média de duração de tratamento de $3,4 \pm 1,6$ meses, enquanto que os doentes sem eosinofilia foram tratados durante uma média de $12,4 \pm 3,4$ meses. No que respeita à sobrevivência global, não foi alcançada a mediana nos doentes sem eosinofilia, ao passo que os que apresentaram eosinofilia faleceram precocemente, o primeiro aos 1,8 meses e o segundo aos 6,8 meses após o início de tratamento. Assim, 12 meses após o início do tratamento, estavam vivos 74,1% dos doentes sem eosinofilia. Estas diferenças foram estatisticamente significativas. (p=0,02)

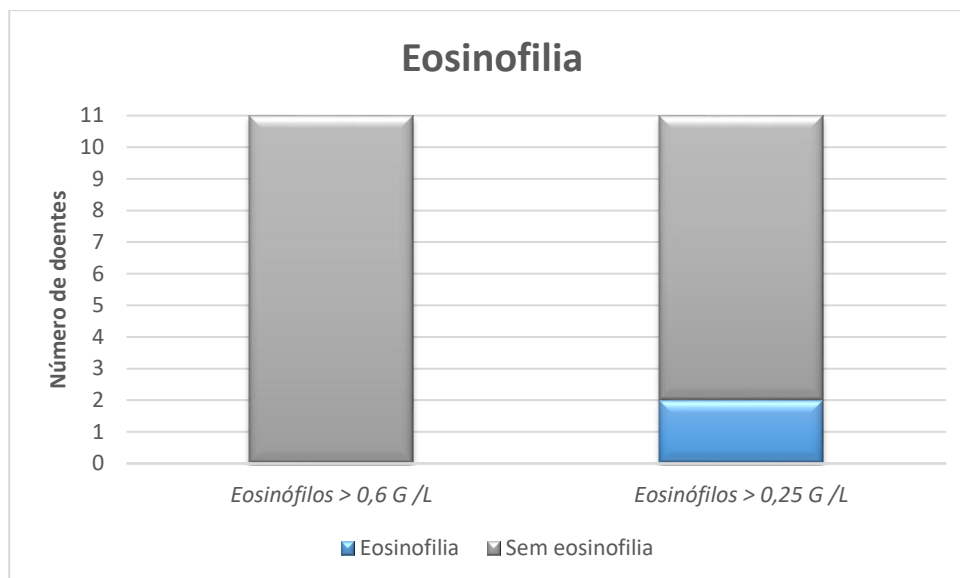


Figura 31 – Presença de eosinofilia em doentes tratados com ruxolitinib. Na primeira coluna a eosinofilia foi definida pela contagem de eosinófilos superior a $0,6 \times 10^9 /L$, enquanto na segunda, o valor de corte obtido foi de $0,25 \times 10^9 /L$.

9.4. Basofilia e tratamento com ruxolitinib

Entre os 11 doentes submetidos ao tratamento com ruxolitinib, dois apresentavam basofilia. (Figura 21) Entre estes, a duração do tratamento foi em média de $3,4 \pm 2,3$ meses, sendo de $12,4 \pm 10,1$ meses entre os doentes que não apresentavam basofilia na altura do diagnóstico de MFP. ($p=0,02$). Os doentes que apresentaram basofilia sobreviveram um máximo de 7 meses após o início do tratamento com ruxolitinib, (um doente 1,8 meses e o outro 6,8 meses), enquanto entre os doentes sem basofilia, a mediana de sobrevivência não foi atingida. Isto corresponde a uma sobrevivência de 88,9% aos 12 meses, nos doentes sem basofilia, comparativamente a uma duração máxima da sobrevivência de apenas 6,8 meses em doentes com basofilia, após o início de tratamento. Estes achados foram estatisticamente significativos. ($p=0,02$)

Apesar de estatisticamente se ter obtido como *cut-off* ideal para separação dos doentes em termos de sobrevivência global o valor de $0,25 \times 10^9 /L$, o que se verificou foi que a aplicação deste novo *cut-off* não resultou em alteração do número de doentes com critério de basofilia, (figura 21)

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

nem induziu variação no tempo das sobrevivências globais dos dois grupos de doentes, mantendo-se os resultados de sobrevivência acima descritos para o ponto de corte prévio ($p=0,02$).

6. DISCUSSÃO

Na nossa amostra de doentes com MFP, observou-se que o diagnóstico foi estabelecido, em média, aos 70 anos de idade, sendo a maior parte dos doentes do género masculino (73%), em concordância com vários outros estudos epidemiológicos sobre a MFP, nos quais a mediana das idades dos doentes ao diagnóstico foi de 66 a 67 anos.^{1,2,9}

Na amostra analisada, a monocitose estava presente ao diagnóstico em 20% dos doentes, não se tendo observado qualquer relação entre a idade do diagnóstico da MFP e a presença de monocitose. Verificou-se que a mediana de sobrevivência global era de quase metade nos indivíduos com monocitose (27,3 meses) quando comparada com os que apresentavam valores normais de monócitos no sangue periférico (46,4 meses), observando-se uma separação das curvas aos 28 meses de seguimento. Não se atingiu, no entanto, o nível de significância estatística.

Resultados semelhantes foram obtidos em vários estudos publicados, demonstrando uma associação entre a monocitose (embora não necessariamente ao diagnóstico) e o pior prognóstico dos doentes com MFP, sendo essa relação mais robusta quando a análise é feita com indivíduos mais jovens.⁴ Num estudo desenvolvido por Boiocchi, et al. (em 2013), foi observada uma associação entre a monocitose (monócitos $> 1 \times 10^9$ /L) e pior prognóstico nos doentes com MFP, tendo-se verificado que os doentes que desenvolviam monocitose significativa e persistente durante o curso da MFP, apesar da terapêutica adequada, apresentavam contagens mais baixas de plaquetas e de hemoglobina e necessidade de transfusões frequentes. Nesse estudo foi também demonstrado que muitos dos doentes faleciam precocemente após o desenvolvimento de monocitose, sendo a sobrevivência mediana de 45 meses após o desenvolvimento da monocitose.¹⁵ Também a análise produzida por Elliott, et al. (em 2007), demonstrou a monocitose absoluta como factor de risco independente para a redução de sobrevivência dos doentes com MFP.¹⁶ No nosso estudo, também observamos redução de sobrevivência global dos doentes quando considerada a monocitose ao

diagnóstico; no entanto, a sobrevivência global mediana da nossa coorte foi de apenas 27 meses após o diagnóstico em doentes que apresentavam a monocitose. É de notar que visto que só foi possível avaliar a monocitose na altura do diagnóstico da MFP, e não antes, não é possível determinar se a monocitose se desenvolveu sincronamente com esta neoplasia mieloproliferativa, ou se foi um fenómeno precedente. Da mesma forma, nos doentes sem monocitose ao diagnóstico, ao contrário de Boiocchi não avaliámos sequencialmente os valores de monocitose dos doentes, durante o seguimento, uma vez que o objectivo primário do nosso trabalho foi avaliar o seu valor prognóstico ao diagnóstico. De facto, o mesmo estudo de Boiocchi, et al. permitiu observar que o desenvolvimento de monocitose se associava à fase avançada da doença, tendo-se identificado alterações morfológicas da medula óssea de alguns doentes, apresentando aspectos compatíveis com leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).¹⁵ Esta patologia corresponde a uma neoplasia *de novo* pertencente ao grupo de síndromes de sobreposição entre SMD e NMP, que se associa a mau prognóstico em termos de sobrevivência, e caracteriza-se pela presença de monocitose absoluta ($> 1 \times 10^9/L$) sustentada (durante $>$ de 3 meses) no sangue periférico, com alterações compatíveis com SMD e NMP na medula óssea, podendo-se apresentar com o fenótipo de SMD ou de NMP.^{3,25,26} Os doentes com o fenótipo de LMMC-NMP apresentam-se com leucocitose, monocitose, hepatoesplenomegália e sintomas constitucionais (como caquexia, dores ósseas e perda de peso) relacionados com a mieloproliferação.^{25,26}

Além dos estudos supra-referidos, avaliando doentes com patologias mielóides, é interessante observar que também existem relatos sobre a importância prognóstica de contagens absolutas de monócitos assim como do rácio linfócitos/monócitos em doentes com linfoma. Deste modo, um estudo produzido por Jakovic, et al. (em 2016) em doentes com linfoma de Hodgkin demonstrou que o rácio linfócitos/monócitos < 2 estava associado a pior prognóstico.¹⁷ É de salientar, contudo, que esse valor do rácio pode estar relacionado não só com a presença de monocitose como também de linfopenia. No entanto, outro estudo, desenvolvido por Ho, et al. (em 2015) em doentes com

linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B demonstrou que os doentes com contagens absolutas de linfócitos baixas ($\leq 1,162 \times 10^9 /L$) e/ou contagens absolutas de monócitos elevadas ($> 5,55 \times 10^9 /L$) apresentaram pior prognóstico, sendo o *score* prognóstico obtido pela divisão destas duas variáveis mais fiável do que o rácio linfócitos/monócitos.²⁷ Deste modo, é possível observar que a monocitose é um marcador de aparente importância prognóstica em hemato-oncologia, sendo transversal a neoplasias das linhagens linfóide e mielóide.

Considerando que as contagens monocítica, basofílica e eosinofílica absolutas são valores contínuos e que as definições dos pontos de corte de “normalidade” destes parâmetros analíticos são académicas, propusemo-nos a identificar se existe algum ponto de corte nestas contagens que, na nossa coorte, melhor dividisse os doentes com sobrevivências mais longas dos doentes com sobrevivências mais curtas.

Assim, para a nossa série foi calculado um novo *cut-off*, que apresentava uma elevada especificidade e permitiu separar melhor os doentes da nossa série em termos de sobrevivência. No entanto, apresentava uma sensibilidade baixa e as curvas de sobrevivência apenas se começaram a separar a partir dos 27 meses de observação. A baixa sensibilidade do *cut-off* é justificada pelo tamanho reduzido da amostra em estudo, o que se reflecte grande variabilidade e, conseqüentemente, na largura do intervalo de confiança a 95%. Deste modo, e tendo também em conta os estudos produzidos em doenças linfóides, observamos que pode ser importante incluir, na determinação do prognóstico, valores de monócitos mais baixos, nomeadamente a partir de $0,75 \times 10^9 /L$, e não apenas superiores a $1 \times 10^9 /L$, como inicialmente avaliámos.

No que respeita à eosinofilia, verificou-se que esta estava presente em 12,7% dos doentes da amostra analisada, não se tendo observado relação entre a presença de eosinofilia e a idade ao diagnóstico da MFP. Utilizando o valor de corte para a eosinofilia de $0,6 \times 10^9 /L$, observou-se que a mediana da sobrevivência global dos doentes com eosinofilia foi de 6,1 meses, sendo mais de cinco vezes superior (de 32,5 meses) em doentes com valor de eosinófilos inferior ao *cut-off*

utilizado. No entanto, a longo prazo, observou-se o cruzamento das curvas ao 57º mês; contudo, deve salientar-se que nesse momento de seguimento já só estava vivo um (1) doente com eosinofilia. Tal como nos propusemos a fazer para a monocitose, foi feito o cálculo de um *cut-off* que melhor diferenciasse os doentes desta nossa série em termos de sobrevivência global, obtendo-se o valor de $0,25 \times 10^9$ eosinófilos/L, que, apesar de apresentar baixa sensibilidade, apresentou um valor elevado de especificidade, com diferença importante entre a sobrevivência global dos doentes com eosinofilia de quase metade em relação aos doentes sem eosinofilia (27,3% versus 43,6%, respectivamente). Deste modo, verificámos que o valor de eosinófilos de $0,25 \times 10^9$ /L distingue melhor os doentes em termos de sobrevivência, assim como em termos de prognóstico, sendo importante reavaliar este valor numa série maior de doentes, de modo a diminuir a variabilidade da amostra e reduzir a largura do intervalo de confiança a 95%, e possivelmente melhorar a sua sensibilidade, podendo no futuro ser uma análise a considerar na avaliação do prognóstico dos doentes com MFP.

Apesar de não haver estudos recentes a avaliar a importância da eosinofilia no prognóstico de NMP, vários autores investigaram a importância prognóstica da avaliação da eosinofilia em SMD. Entre eles, o estudo produzido por Matsushima, et al, (em 2003) verificou que a eosinofilia da medula óssea é factor de pior prognóstico nos doentes com SMD.²⁸ Também no estudo realizado por Wimazal, et al. (em 2010), verificou-se existir relação entre os níveis de eosinófilos no sangue periférico com o prognóstico dos doentes com SMD, observando-se que esta se relaciona com uma redução significativa da sobrevivência dos doentes com SMD.²⁰

Além disso, num estudo de Schooley, et al., desenvolvido em 1980, observou-se que doentes com NMP (com hiper celularidade da medula óssea, anomalias em múltiplas linhagens celulares, mielofibrose, esplenomegália e níveis séricos elevados de vitamina B12) e eosinofilia $> 1,5 \times 10^9$ /L respondiam pior à corticoterapia e a doença apresentava um comportamento mais agressivo.²⁹ Actualmente, foram identificados múltiplos genes cuja presença se relaciona com o

desenvolvimento de eosinofilia em doentes com NMP, encontrando-se entre os mais frequentes as mutações nos genes PDGFRA, PDGFRB e FGFR1, incluindo o gene de fusão FIP1L1-PDGFRB.^{30,31} Além da eosinofilia, a presença do gene de fusão FIP1L1-PDGFRB foi também associada a fibrose da medula óssea e a presença de agregados de mastócitos; achados semelhantes foram também encontrados em doentes com rearranjos dos genes PDGFRB e JAK2.³¹ O gene de fusão FIP1L1-PDGFRB foi também encontrado em doentes com LMA ou com linfoma linfoblástico de células T associados a eosinofilia.³² Por outro lado, os doentes com rearranjos no gene PDGFRB também apresentam graus variados de monocitose, além da eosinofilia, apresentando achados sugestivos de LMMC ou de leucemia mielóide crônica atípica (LMCa).³¹ Na nossa série, não foi possível obter informação do estudo mutacional dos genes mais frequentemente envolvidos na maioria dos doentes, relativamente a qualquer uma destas alterações, que nos permitisse tecer conclusões.

Deste modo, a presença de eosinofilia é um parâmetro importante a considerar, no futuro, na avaliação do prognóstico de doentes com NMP, nomeadamente em doentes com MFP. Adicionalmente, em doentes com eosinofilia pode ser importante fazer a pesquisa das mutações supracitadas, quer para confirmar a presença de eosinófilos clonais, quer para a escolha da terapêutica adequada, visto que doentes com NMP e eosinofilia que apresentam o gene de fusão FIP1L1-PDGFRB respondem à terapêutica com imatinib.³²

No nosso estudo, a basofilia (basófilos $> 0,2 \times 10^9/L$) estava presente em 30,9% dos doentes, observando-se que os doentes com basofilia tinham uma sobrevivência global inferior à dos doentes que apresentavam contagens normais de basófilos no sangue periférico (sobrevivência global mediana de 25,6 meses versus 32,5 meses), sendo esta relação visível a partir do final do segundo ano de seguimento dos doentes, quando as curvas se começam a separar. Ao realizar o cálculo de um novo *cut-off*, obtivemos o valor de $0,25 \times 10^9$ basófilos/L, com uma especificidade de 88,9%. Este valor, apesar de diferenciar melhor os doentes com basofilia dos que não tinham basofilia, com

uma sobrevivência global mediana de apenas um terço (19,7 versus 46,4 meses, respectivamente), não alterou, em número, os doentes codificados como tendo critério de basofilia. Tal como verificado com os parâmetros monocitose e eosinofilia, a recodificação, apesar de específica, apresentava um baixo valor da sensibilidade relacionado com o tamanho reduzido da amostra, o que se verifica pela elevada variação do intervalo de confiança.

Num estudo produzido por Wimazal, et al. (em 2010), para a avaliação dos efeitos da basofilia, no prognóstico e sobrevivência em doentes com SMD o *cut-off* encontrado para melhor separar os doentes em termos de sobrevivência foi também de $0,25 \times 10^9$ basófilos/L, observando-se pior prognóstico e significativamente menor sobrevivência global em doentes com níveis superiores de basófilos no sangue periférico.²⁰ Outro estudo, do grupo de Matsushima, et al. (em 2003), que avaliou o valor prognóstico de basofilia na medula óssea em doentes com SMD, também relacionou o aumento nas contagens de basófilos com pior prognóstico, menor sobrevivência global e maior risco de progressão para LMA.²⁸ Por outro lado, a eosinofilia e a basofilia são frequentemente encontradas em doentes com LMC, havendo vários estudos que associam o aumento do valor da basofilia, na presença ou não de eosinofilia, a pior prognóstico e, nomeadamente, à fase da aceleração da doença.¹⁹⁻²¹

No nosso estudo, foi também feita a avaliação do impacto das alterações analíticas em mais do que um dos parâmetros prognósticos estudados (basofilia, eosinofilia e monocitose), tendo-se observado que a sobrevivência global dos doentes que apresentavam alterações em pelo menos um parâmetro prognóstico era de apenas metade (28,5 meses) quando comparados com doentes com valores normais em todos os parâmetros prognósticos (56,1 meses). Esta relação é ainda mais marcada quando são utilizados os valores de novos *cut-offs*, sendo a mediana da sobrevivência global inferior a metade (27,9 meses) dos doentes sem alterações analíticas nos parâmetros estudados (64,4 meses).

AValiação da Influência das Contagens de Basófilos, Eosinófilos e Monócitos no Prognóstico da Mielofibrose Primária

Apesar de não existir nenhum estudo recente a relacionar a eosinofilia e basofilia com o prognóstico dos doentes com MFP, no estudo produzido por Wimazal, et al. (em 2010) em doentes com SMD, observou-se, além da relação entre os níveis elevados eosinófilos ou basófilos no sangue periférico com o pior prognóstico dos doentes com SMD, que a presença de alterações em ambos os parâmetros (eosinofilia e basofilia) se associa a redução ainda mais significativa da sobrevivência dos doentes.²⁰ No estudo produzido por Matsushima, et al. (em 2003) também se verificou que a presença de alterações em ambos os parâmetros da linhagem mielóide é preditora de pior prognóstico em doentes com SMD.²⁸

No nosso estudo, tentámos também avaliar o efeito do tratamento com ruxolitinib sobre o prognóstico conferido pela eosinofilia, basofilia e/ou monocitose, para determinar se estes parâmetros continuam relevantes na era do ruxolitinib. No entanto, em 11 doentes da nossa coorte que foram tratados com ruxolitinib, apenas 1 apresentava monocitose (2 se for considerado o novo *cut-off*), 2 tinham basofilia, e nenhum doente apresentava eosinofilia (2 de acordo com o novo *cut-off*), o que não confere à nossa amostra qualquer grau de poder estatístico para análise. Porém, verificou-se que nos doentes que não apresentavam basofilia, eosinofilia nem monocitose, a mediana de sobrevivência não foi alcançada, enquanto os que apresentaram monocitose ou basofilia (ou eosinofilia, se considerarmos o novo *cut-off*) apresentaram uma duração máxima de sobrevivência, após o início de tratamento, marcadamente reduzida, entre 2 e 7 meses.

Este estudo retrospectivo permitiu concluir que tanto a monocitose como a basofilia e eosinofilia se apresentam como parâmetros potencialmente com valor relevante na avaliação do prognóstico dos doentes com MFP, na medida em que parecem permitir separar os doentes em termos de sobrevivência global, originando grupos distintos de doentes, permitindo seleccionar a abordagem terapêutica mais específica para cada um deles.

É de notar que os *scores* de prognóstico actualmente utilizados (DIPSS-*plus* e IPSS) em doentes com MFP são constituídos por múltiplos parâmetros (idade > 65 anos, hemoglobina < 10

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

g/dL, leucocitose $> 25 \times 10^9/L$, blastos circulantes $\geq 1\%$, sintomas constitucionais, dependência de transfusões de eritrócitos, contagem de plaquetas $< 100 \times 10^9/L$ e cariótipo desfavorável) ^{4,33} para permitir dividir os doentes em grupos, de acordo com o risco de morte ou de desenvolver eventos, de forma mais específica, sendo a avaliação de vários factores importante para aumentar a robustez do *score*. Como tal, sugerimos que a integração dos parâmetros prognósticos estudados neste trabalho, dentro dos modelos actualmente utilizados, poderá vir a ser uma mais valia, permitindo melhorar a acurácia prognóstica dos mesmos e seleccionar a abordagem terapêutica com maior precisão. Além disso, é importante salientar que a análise da eosinofilia, basofilia e monocitose é uma técnica simples, económica e que pode ser realizada em qualquer hospital, quer em países desenvolvidos como nos que estão em desenvolvimento, permitindo avaliar doentes de todas as classes económicas.

Apesar da importância dos nossos achados, o nosso estudo apresenta algumas limitações. Para a realização deste estudo, optámos por fazer uma análise retrospectiva devido à limitação temporal subjacente ao contexto em que o estudo foi desenvolvido, e à duração da história natural da doença. De facto, apesar de se ter obtido uma sobrevivência global mediana dos doentes nesta coorte de 32,5 meses, sabe-se que a sobrevivência de alguns doentes é muito maior, reduzindo as opções alternativas para o tipo de estudo a desenvolver, apesar de todas as limitações a ele associadas. Por outro lado, tratando-se de um estudo unicêntrico, o tamanho da nossa amostra ficou intrinsecamente condicionado pelo número de doentes diagnosticados e seguidos nos HUC-CHUC; adicionalmente, ao optar aplicar estritamente os critérios de diagnóstico da MFP de acordo com a OMS 2016, alguns doentes foram excluídos por falta de registos no processo de todos os dados que permitissem a aplicação desses critérios, nomeadamente pela ausência de informação adequada a 2016 nos relatórios de biópsia óssea feitos ao longo dos 12 anos sobre os quais incidiu este estudo. Deste modo, a dimensão da amostra obtida não permitiu conferir ao estudo o poder estatístico necessário à obtenção de significância estatística na análise das diferenças de sobrevivência por grupos,

segundo os métodos de Wilcoxon e de *log-rank*, apesar das marcadas diferenças numéricas absolutas e claras diferenças visuais em termos de separação de curvas de sobrevivência calculadas pelo método de Kaplan-Meier; este fenómeno reflecte-se no facto de parâmetros com valor prognóstico claramente descritos na literatura (como a idade > 65 anos e a leucocitose > 25 G/L) não terem na nossa amostra alcançado significância estatística. Como tal, seria pertinente realizar um estudo prospectivo com um longo intervalo de observação, de modo a incluir um número de doentes adequado aos cálculos prévios de tamanho de amostra necessária, realizados com base no poder estatístico desejado para detectar diferenças estatisticamente significativas.

Adicionalmente, devido às mesmas limitações acima apontadas, não foi possível avaliar o impacto dos parâmetros prognósticos estudados na sobrevivência livre de progressão dos doentes, nomeadamente pela ausência de quantificação da percentagem de blastos no sangue periférico ou medula óssea dos doentes, próximo da data do UCM ou da morte.

Além disso, também o baixo valor das sensibilidades obtido para os novos *cut-offs* calculados de monocitose, eosinofilia e basofilia, está relacionado com o reduzido tamanho da amostra, o que se observa pela elevada variação observada no intervalo de confiança dos mesmos.

Deverá compreender-se que os índices individuais incluídos em *scores* prognósticos clássicos como o IPSS e o DIPSS-*plus* (como a anemia, a leucocitose, ou a trombocitopenia) apresentam, isoladamente, baixa sensibilidade; é a sua análise em conjunto, e a utilização de parâmetros com elevada especificidade, que permite criar um *score* prognóstico robusto, com uma sensibilidade global elevada. Da mesma forma, não se pretende que os parâmetros prognósticos por nós estudados neste trabalho sejam aplicados como biomarcadores isolados; de facto, apesar da sua baixa sensibilidade, estes apresentam elevada especificidade, o que favorece a sua inclusão dentro de *scores* prognósticos semelhantes aos actualmente utilizados.

Assim, estudos alargados possibilitarão uma avaliação mais precisa dos parâmetros prognósticos existentes e dos que nos propusemos a estudar com esta análise, permitindo ultrapassar

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

as limitações com que nos deparamos neste estudo e determinar com maior precisão quer a importância prognóstica dos parâmetros estudados, quer os *cut-offs* adequados aos nossos novos parâmetros, para melhor separação dos doentes em grupos de risco, e sua adição aos parâmetros prognósticos em uso actual, de modo a obter conclusões mais robustas.

7. CONCLUSÃO

Em suma, os *scores* actualmente usados para predição do prognóstico da MFP são constituídos por vários parâmetros de modo a permitir uma separação mais específica dos doentes em grupos de risco. Através deste estudo foi possível concluir que a presença quer de monocitose como de eosinofilia ou basofilia aparentam ser factores de pior prognóstico em doentes com MFP, traduzindo-se em redução da sobrevivência global destes doentes. Como tal, e visto que a análise destes parâmetros é simples e facilmente exequível em qualquer estabelecimento de saúde, a sua integração dentro de *scores* prognósticos actualmente existentes permitiria aumentar a sua robustez e o acesso aos mesmos a todas as classes socioeconómicas.

No entanto, é importante realizar estudos prospectivos em séries maiores de doentes, de modo a validar a importância da monocitose, eosinofilia e basofilia em outros grupos populacionais, e a determinar os valores de corte mais precisos e com mais acurácia prognóstica para estes parâmetros.

8. AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho. Desde já à minha orientadora, Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro pela orientação, apoio, saber que transmitiu e colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho, à Dra. Marta Pereira, minha co-orientadora, pela orientação e ensinamentos transmitidos não só durante a realização deste trabalho mas também durante o meu percurso académico.

Agradeço também ao Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, a médicos, enfermeiros e administrativos, que me ajudaram durante todo o processo de recolha de informação clínica essencial para a produção deste estudo.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos Pedro Nuno Pereira, Isabel Sampaio Graça e Ana Cristina Gonçalves que estiveram sempre do meu lado durante esta fase, e cujo apoio, força e companheirismo foram essenciais em determinados momentos difíceis.

Por último, dirijo um agradecimento especial aos meus pais que sempre me incentivaram a fazer mais e melhor, a enfrentar todos os desafios e que sempre me deram força e alegria para seguir em frente. Tenho-vos um reconhecimento muito especial, pelo amor incondicional e pelo apoio incansável que me deram aos longo de todos estes anos.

Obrigada por tudo!

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2014;89(9):915-925.
2. Souza MC, Rodrigues CA, Silva MRR, et al. Application of five prognostic survival scores to primary myelofibrosis in 62 Brazilian patients. *Med Oncol.* 2013;30(2).
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937-951.
4. Bose P, Verstovsek S. The evolution and clinical relevance of prognostic classification systems in myelofibrosis. *Cancer.* 2016;122(5):681-692.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-2406.
6. Mughal I, Vaddi K, Sarlis NJ, Verstovsek S. Myelofibrosis-associated complications: pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. *Int J Gen Med.* 2014;7:89-101.
7. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood.* 2008;112(1):141-149.
8. Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, Vannucchi AM. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: Hidden behind the reticulum. *Am J Hematol.* 2014;89(5):453-456.
9. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: The Mayo Clinic experience. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(1):25-33.
10. Dupriez BB, Morel P, Demon JL, et al. Prognostic Factors in Agnogenic Myeloid Metaplasia: *Blood.* 1996;88(3):1013-1019.

11. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *System*. 2009;113(13):2895-2901.
12. Reilly JT, McMullin MF, Beer PA, et al. Guideline for the diagnosis and management of myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2012;158(4):453-471.
13. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, 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. *J Clin Oncol*. 2011;29(4):392-397.
14. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1356-1363.
15. Boiocchi L, Espinal-Witter R, Geyer JT, et al. Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. *Mod Pathol*. 2012;26(10):204-212.
16. Elliott MA, Verstovsek S, Dingli D, et al. Monocytosis is an adverse prognostic factor for survival in younger patients with primary myelofibrosis. *Leuk Res*. 2007;31(11):1503-1509.
17. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Andjelic BM, et al. Prognostic value of lymphocyte/monocyte ratio in advanced Hodgkin lymphoma: correlation with International Prognostic Score and tumor associated macrophages. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(8):1839-1847.
18. Ho C-L, Lu C-S, Chen J-H, Chen Y-G, Huang T-C, Wu Y-Y. Neutrophil/Lymphocyte Ratio, Lymphocyte/Monocyte Ratio, and Absolute Lymphocyte Count/Absolute

- Monocyte Count Prognostic Score in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Useful Prognostic Tools in the Rituximab Era.
19. Denburg JA, Browman G. Prognostic implications of basophil differentiation in chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 1988;27(2):110-114.
 20. Wimazal F, Germing U, Kundi M, et al. Evaluation of the prognostic significance of Eosinophilia and Basophilia in a larger cohort of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2010;116(10):NA - NA.
 21. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 1988;61(7):1441-1446.
 22. Vannucchi AM, Kantarjian HM, Kiladjian J-J, et al. A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase III trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. *Haematologica*. 2015;100(9):1139-1145.
 23. Arana Yi C, Tam CS, Verstovsek S. Efficacy and safety of ruxolitinib in the treatment of patients with myelofibrosis. *Future Oncol*. 2015;11(5):719-733.
 24. George TI. Malignant or benign leukocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:475-484.
 25. Patnaik MM, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2016 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016;91(6):631-642.
 26. Patnaik MM, Tefferi A, Lanier WL, Jopke TL, Sankey KD, Smith NM. Chronic Myelomonocytic Leukemia: Focus on Clinical Practice. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(2):259-272.
 27. Ho C-L, Lu C-S, Chen J-H, Chen Y-G, Huang T-C, Wu Y-Y. Neutrophil/Lymphocyte Ratio, Lymphocyte/Monocyte Ratio, and Absolute Lymphocyte Count/Absolute Monocyte Count Prognostic Score in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Useful Prognostic Tools in the Rituximab Era. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(24):e993.

AValiação DA INFLUÊNCIA DAS CONTAGENS DE BASÓFILOS, EOSINÓFILOS E MONÓCITOS
NO PROGNÓSTICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

28. Matsushima T, Handa H, Yokohama A, et al. Prevalence and clinical characteristics of myelodysplastic syndrome with bone marrow eosinophilia or basophilia. *Blood*. 2003;101(9):3386-3390.
29. Schooley RT, Flaum MA, Gralnick HR, Fauci AS. A clinicopathologic correlation of the idiopathic hypereosinophilic syndrome. II. Clinical manifestations. *Blood*. 1981;58(5):1021-1026.
30. Klion AD. Eosinophilic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:257-263.
31. Reiter A, Grimwade D, Cross NCP. Diagnostic and therapeutic management of eosinophilia-associated chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2007;92(9):1153-1158.
32. Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders 2014 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2014;89(3):325-337.
33. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, 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. *J Clin Oncol*. 2011;29(4):392-397.