

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Renata Mendes de Freitas

**ANÁLISES DE MUTAÇÕES NO GENE *JAK2* EM PACIENTES COM
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE POLICITEMIA VERA ATENDIDOS EM
UM ÚNICO CENTRO DA CIDADE DE JUIZ DE FORA**

JUIZ DE FORA

2014

RENATA MENDES DE FREITAS

**ANÁLISES DE MUTAÇÕES NO GENE *JAK2* EM PACIENTES COM
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE POLICITEMIA VERA ATENDIDOS EM
UM ÚNICO CENTRO DA CIDADE DE JUIZ DE FORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno C. Maranduba

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

JUIZ DE FORA

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendes de Freitas, Renata.

Análises de mutações no gene JAK2 em pacientes com diagnóstico clínico de Policitemia Vera atendidos em um único centro da cidade de Juiz de Fora / Renata Mendes de Freitas. - 2014.

72 p. : il.

Orientador: Carlos Magno da Costa Maranduba

Coorientador: Marcelo de Oliveira Santos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Neoplasias Mieloproliferativas. 2. Policitemia Vera. 3. Via de sinalização JAK-STAT. 4. PCR-AE. I. Magno da Costa Maranduba, Carlos, orient. II. de Oliveira Santos, Marcelo, coorient. III. Título.

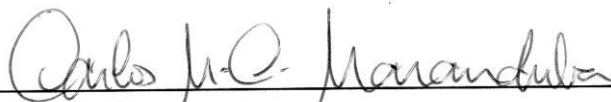
RENATA MENDES DE FREITAS

“Análises de mutações no gene JAK2 em pacientes com diagnóstico clínico de Policitemia vera atendidos em um único centro da cidade de Juiz de Fora”

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 21 / 02 / 2014 .

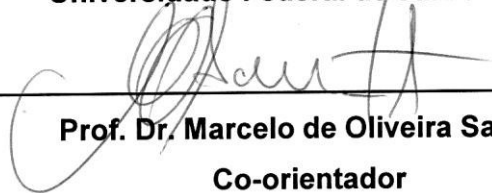
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Co-orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Profª. Drª. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Abrahão Elias Hallack Neto

Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus Pais, fonte da minha Vida,
e todos que fizeram parte do processo
de realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade e contribuição no enriquecimento do meu conhecimento científico.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pela bolsa de incentivo à pesquisa.

Aos Professores Dr. Carlos Magno C. Maranduba e Dr. Marcelo de Oliveira Santos pelo apoio, confiança e incentivo no aprimoramento dos meus conhecimentos que me permitiram concretizar um trabalho no qual me sinto honrada e imensamente feliz.

Aos demais Professores do Programa de Pós-Graduação que se fizeram presentes sempre que necessário.

Aos membros da banca que aceitaram fazer parte desse trabalho, dedicando tempo e atenção. Obrigada Profa. Dra. Enilze Ribeiro pelo acolhimento no Laboratório de Oncogenética e Citogenética Humana/ UFPR.

Aos médicos Dr. Angelo Atalla, Dr. Abrahão Elias Hallak Neto e Dra. Andréia Nicolato, do Setor de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do HU/UFJF, que acreditaram nesse projeto e se disponibilizaram a ajudar no que fosse necessário.

Aos pacientes, que mesmo fragilizados, aceitaram participar do estudo com a maior vontade de que tudo desse certo.

Às enfermeiras e demais funcionários do Hospital ASCOMCER que tornaram possível a concretização desse trabalho.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Genética e Biotecnologia, em especial o Francisco Guia, que em meio amostras de sangue aqui e lá, sempre se fez presente.

Ao Lucas Mendes, pela dedicação e comprometimento nos estudos de artigos e acompanhamento das coletas de dados e de amostras dos pacientes.

Aos amigos presentes e ausentes, que me proporcionaram momentos de descanso e lazer, e que sempre foram motivação para seguir adiante, mesmo nos momentos mais difíceis.

À amiga Talitha Caiafa, pelos dois anos de amizade, companheirismo e muitas risadas.

Aos demais amigos de longe, que se fazem presentes em todos os momentos. Em especial, ao Luiz Gustavo (LUGU), que sabe o quanto é gratificante a sensação de dever cumprido. Obrigada pelas conversas, dicas e conselhos.

À minha família, meus pais Maria José e Wilson, e irmãos Patrícia e Wilson Jr., que me deram amor, carinho e foram os que mais torceram por mim durante toda minha trajetória acadêmica. Graças a vocês eu consegui.

RESUMO

As Neoplasias Mieloproliferativas são originadas por uma proliferação clonal de um progenitor hematopoético. Descrita inicialmente em 1951 como “Doenças Mieloproliferativas” e reavaliada pela Organização Mundial da Saúde em 2011, as Neoplasias Mieloproliferativas agrupam a Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Miefibrose Primária em um subgrupo chamado de BCR-ABL negativo. De acordo com a revisão dos critérios adotados para o diagnóstico das Neoplasias Mieloproliferativas a presença da mutação JAK2 V617F é considerada critério de maior importância para o diagnóstico do subgrupo BCR-ABL negativo representando um marcador clonal. A Policitemia Vera é principalmente diagnosticada por um aumento na massa eritrocitária independente de fator estimulante, aumento de leucócitos no sangue periférico, esplenomegalia e trombocitose. Ocorre, geralmente, em homens e mulheres com faixa etária de 60 anos, com incidência de 0,7 a 2,6/100.000 habitantes/ano. A mutação V617F no gene *JAK2* produz uma proteína alterada que ativa constitutivamente a via JAK-STAT e outras vias *downstream* de modo que, as proteínas de ativação transcricional e transdutoras de sinal (STAT do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*) são fosforiladas posteriormente impactando na expressão de genes envolvidos na regulação da apoptose e proteínas regulatórias, além de alterar a taxa de proliferação das células hematopoéticas. Neste trabalho foram selecionados 26 pacientes com Policitemia Vera, os quais foram atendidos na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Foram realizadas análises de mutações no gene *JAK2* a partir do material genético isolado do sangue periférico. Os dados clínicos de cada paciente foram relacionados entre si e correlacionados com os dados moleculares.

Palavras-chave: Neoplasias Mieloproliferativas, Policitemia Vera, Via de sinalização JAK-STAT, PCR-AE

ABSTRACT

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are caused by a clonal proliferation of a hematopoietic progenitor. First described in 1951 as “Myeloproliferative Diseases” and reevaluated by the World Health Organization in 2011 (WHO, 2011), the Myeloproliferative Neoplasms gather the Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrose in a subgroup called negative BCR-ABL. According to WHO the revised diagnosis criteria for myeloproliferative neoplasms, the presence of JAK2 V617F mutation, is considered the most important criterion for the diagnosis of negative BCR-ABL subgroup representing a clonal marker. The Polycythemia Vera is primarily diagnosed by an independent stimulating factor in red cells mass increasing, followed by an increase of leukocytes in peripheral blood, spleen and thrombocytosis. It usually occurs in men and women of all age groups with higher incidence in 60-year-old patients ranging from 0.7 to 2.6/ 100.000 hab/year. The V617F mutation in the *JAK2* gene produces an altered protein that activates constitutively the JAK-STAT pathway and other pathways downstream as a result the protein transcriptional activation and signal transduction (STAT) are subsequently phosphorylated causing impact in the expression of genes involved in regulation of apoptosis and regulatory proteins, as well as altering the rate of proliferation of hematopoietic cells. In this study 26 patients with Polycythemia Vera were selected in Juiz de Fora, Minas Gerais. The peripheral blood was used for genetic material isolation (JAK2 mutation). The clinical data of each patient were related to each other and correlated with the molecular data.

Keywords: Myeloproliferative Neoplasms, Polycythemia Vera, pathway signaling JAK-STAT, PCR-EA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE <i>JAK2</i> ATÉ O PRESENTE MOMENTO E MOSTRADAS AO LONGO DOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA <i>JAK2</i>	23
FIGURA 2: ESTRUTURA DE UM RECEPTOR TIPO I.....	26
FIGURA 3: ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS SOCS.....	29
FIGURA 4: PROPORÇÃO DE PACIENTES COM PV, TE E MFP COM DIFERENTES ANORMALIDADES GENÉTICAS ASSOCIADAS À VIA JAK-STAT.	31
FIGURA 5: ESQUEMA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS POR UMA CITOCINA AO SE LIGAR NO RECEPTOR.....	33
FIGURA 6: FLUXOGRAMA DAS ETAPAS METODOLÓGICAS.....	43
FIGURA 7: ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DA PCR-AE.	45
FIGURA 8: GEL DE AGAROSE 2%. GENOTIPAGEM PARA <i>JAK2</i> V617F DE ALGUMAS DAS AMOSTRAS POSITIVAS	50
FIGURA 9: GEL DE AGAROSE 2%. GENOTIPAGEM PARA <i>JAK2</i> V617F.	51
FIGURA 10: HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA DO PACIENTE F.L.C.T.	52
FIGURA 11: HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA DA PACIENTE T.G.....	53

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA PV DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008.....	42
QUADRO 2: <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA PCR-AE	46
QUADRO 3: DADOS CLÍNICO-HEMATOLÓGICOS APRESENTADOS PELOS PACIENTES.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS	19
TABELA 2: RELAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS OBSERVADOS EM RELAÇÃO A EVENTOS TROMBÓTICOS E AS MUTAÇÕES EM <i>JAK2</i>	53

LISTA DE SIGLAS

NMP Neoplasias Mieloproliferativa
HU Hospital Universitário
UFJF Universidade Federal de Juiz de Fora
SUS Sistema Único de Saúde
OMS Organização Mundial da Saúde
LMC Leucemia Mieloide Crônica
PV Policitemia Vera
MFP Mielofibrose Primária
TE Trombocitemia Essencial
LNC Leucemia Neutrófila Crônica
LEC Leucemia Eosinófila Crônica não especializada
DM Doença do Mastócito
NMPSC Neoplasias Mieloproliferativas Sem Classificação
JAK2 Janus Kinase 2
ATP Adenosina Trifosfato
EPO Eritropoetina
EPO-R Receptor de Eritropoetina
IL Interleucinas
IFN Interferon
CGF Fator Estimulante de Colônias
GM-CSF Fator Estimulante de Colônias de Monócitos e Granulócitos
TPO-R Receptor de Trombopoetina
STAT Proteínas Ativadoras de Transcrição e Transdutoras De Sinal
DNA Ácido Desoxirribonucleico
EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
PCR-AE Reação Em Cadeia de Polimerase Alelo Específico
dNTP Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
pb Pares de Bases de Nucleotídeos
kDa Quilodalton
MPL Virus da Leucemia Mieloproliferativa

PIAS Proteínas inibitórias de STAT ativadas

LOH Perda de Heterozigose

LMA Leucemia Mielóide Aguda

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CORRELAÇÃO DE TERMOS USADOS EM INGLÊS

Primer Forward (F) oligonucleotídeo iniciador (5' – 3')

Primer Reverse (R) oligonucleotídeo iniciador (3' - 5')

Feedback retroalimentação

Downstream jusante

Pellet componente sólido resultante da centrifugação

Overnight durante a noite

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS	18
2.1.1 PATOGÊNESE DAS NMPs.....	20
2.1.2 O GENE <i>JANUS KINASE 2 (JAK2)</i>	21
2.1.3 A PROTEÍNA JAK2.....	22
2.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO JAK-STAT.....	25
2.2.1 OS RECEPTORES DE SINALIZAÇÃO	25
2.2.2 O FUNCIONAMENTO DAS JAK.....	27
2.2.3 REGULADORES NEGATIVOS DA VIA JAK-STAT.....	29
2.2.4 A MUTAÇÃO NO GENE <i>JAK2</i> E A ALTERAÇÃO NO FUNCIONAMENTO DA PROTEÍNA	31
2.3 A POLICITEMIA VERA	33
3 OBJETIVOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 PACIENTES E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	41
4.2 COLETAS DE DADOS.....	42
4.3 METODOLOGIA	42
4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	43
4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	44
4.3.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE ALELO- ESPECÍFICO (PCR-AE)	45
4.3.4 DIGESTÃO ENZIMÁTICA COM <i>Bsa XI</i>	46
4.3.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO.....	47
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	57
8 REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

As Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs) são doenças clonais de células-tronco hematopoéticas, nas quais há proliferação aumentada da linhagem mielóide com maturação eficaz, resultando em leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocitária e podem evoluir para fibrose medular ou transformação leucêmica. Em 1951, Dameshek identificou o primeiro caso de NMP e as denominou como “Doenças Mieloproliferativas”. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2011, alterou este termo para “Neoplasias Mieloproliferativas”, sendo a Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP) denominadas de neoplasias BCR-ABL negativas crônicas. Essas três patologias compartilham características clínicas comuns, tais como proliferação de células-tronco hematopoéticas independentes de fatores de crescimento, hiperplasia da medula óssea, risco aumentado de eventos trombóticos e de hemorragia, progressão para leucemia aguda e fibrose da medula óssea (DAMESHEK, 1951; SPIVAK *et al.*, 2003; FINAZZI e BARBUI, 2007; HAFERLACH, 2008).

A Policitemia Vera é caracterizada, principalmente, por um aumento na proliferação das linhagens celulares mielóides, predominantemente eritrócitos, independente dos mecanismos reguladores comuns da eritropoese (EPO). Cerca de 95% dos pacientes têm a mutação JAK2 V617F. A PV apresenta duas fases, a primeira é pré-policitêmica e uma segunda, policitêmica, associada com o aumento da massa de eritrócitos. Essa última fase pode levar a uma terceira fase pós-policitêmica mielofibrótica, envolvendo citopenias, hematopoese ineficaz, fibrose da medula óssea, hematopoese extramedular e esplenomegalia, podendo progredir para um estágio leucêmico agudo. A incidência desta doença aumenta com o avançar da idade, entre 0,7 e 2,6 por 100.000 hab./ano. Não há uma prevalência entre homens e mulheres, sendo a idade média do diagnóstico próxima aos 60 anos, com ocorrências raras em idades inferiores. A ocorrência de eventos trombóticos em pacientes com PV foi relatada nesse estudo, onde chamamos a atenção para a alta frequência obtida e salientamos para a importância de se investigar a presença de neoplasias mieloproliferativas em pacientes com histórico de trombose de causa desconhecida (MODAN, 1965; TEFFERI *et al.*, 2009; KIM, HADDAD e ATALLAH, 2012; PASSAMONTI *et al.*, 2012).

Estudos realizados em 2005 apontaram a identificação de anormalidades no funcionamento da proteína *Janus kinase 2*, expressa pelo gene *JAK2*, onde uma mutação de sentido trocado no éxon 14 do gene *JAK2* (g.1849 G>T) acarreta a substituição de uma Valina por uma Fenilalanina na posição 617 localizado no domínio pseudoquinase JH2 da proteína e responsável por ativar constitutivamente a via de sinalização JAK-STAT e demais vias *downstream* (DUNNEN e ANTONARAKIS, 2000; SPIVAK *et al.*, 2003; KAUSHANSKY, 2007; VANNUCCHI *et al.*, 2007; TEFFERI, 2008; JONES *et al.*, 2009; VAINCHENKER *et al.*, 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

As Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs) são doenças resultantes da expansão clonal de células-tronco hematopoéticas da medula óssea, levando à hematopoese aumentada e maturação preservada de uma ou mais linhagens mielóides (granulocítica, eritrocítica, megacariocítica ou mastocítica) (DAMESHEK, 1951; SPIVAK *et al.*, 2003; FINAZZI e BARBUI, 2007; HAFERLACH, 2008).

Dameshek (1951) identificou um amplo espectro de doenças compartilhando características básicas que foram agrupadas sob o termo de “Doenças Mieloproliferativas”. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2011) trouxe uma nova classificação para os tumores do tecido hematopoético e linfóide, alterando esse termo para Neoplasias Mieloproliferativas. As NMPs incluem a Leucemia Mieloide Crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Mielofibrose Primária (MFP), Trombocitemia Essencial (TE), Leucemia Neutrofílica Crônica (LNC), Leucemia Eosinofílica Crônica não especificada (LEC), Doença do Mastócito (DM) e Neoplasias Mieloproliferativas sem classificação (NMPSC) (KAUSHANSKY, 2007; LANDGREN *et al.*, 2008; TEFFERI *et al.*, 2009; VARDIMAN *et al.*, 2009; KILADJIAN, 2012; KIM *et al.*, 2013). A LMC é caracterizada pela presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph), resultante da translocação entre os cromossomos 9 e 22. O gene híbrido assim formado, *BCR-ABL* codifica uma proteína de 210 kDa com atividade de tirosino quinase que afeta o crescimento e a diferenciação celular (CHAUFFAILLE, 2010).

Os demais subtipos de NMPs (PV, TE e MFP) são chamadas de *BCR-ABL* negativas crônicas que compartilham características comuns, tais como a proliferação de células hematopoéticas independentes de fatores de crescimento, hiperplasia da medula óssea decorrente da proliferação exacerbada dos componentes da linhagem mielóide e que conduz à leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocítica, aumento do risco de eventos trombóticos e sangramentos espontâneos, hematopoese extramedular, e podem convergir para

leucemia aguda e fibrose da medula óssea (SCHAFER, 2006; TEFFERI, 2012).

Na tabela 1 apresentamos os tipos de NMPs, bem como as incidências e os aspectos clínicos sobre cada uma delas.

TABELA 1: Neoplasias Mieloproliferativas

	Incidência (no. casos/100.000 hab./ano)	Aspecto Clínico
LMC	1,5 1,3 homens: 1 mulher	Leucocitose, esplenomegalia, fraqueza, cansaço.
PV	0,7 a 2,6	Cefaleia, pletora, cansaço, tontura e sudorese. Cerca de 40% dos pacientes apresentam pruridos (atribuído ao aumento de histamina e ao número de mastócitos na pele), 33% apresentam episódios trombóticos (AVC, síndrome de Budd-Chiari, infarto do miocárdio, tromboembolismo pulmonar ou trombose venosa profunda). Sangramentos também são descritos (25% dos casos).
MFP	0,5 a 1,5	25% dos pacientes são assintomáticos. Os demais apresentam sintomas secundários à anemia, esplenomegalia, estado hipermetabólico (perda de peso, sudorese noturna ou febre), eritropoese extramedular, sangramentos (petéquias, hemorragia em trato gastrointestinal), alterações ósseas (dor nas articulações ou osteoesclerose), hipertensão portal (ascite, varizes de esôfago ou gástricas, sangramento de TGI, encefalopatia hepática, trombose de veia porta ou hepática).
TE	1 a 2	Um terço a um quarto dos pacientes é sintomático ao diagnóstico e 25% a 48% apresentam esplenomegalia. Sintomas vasomotores, caracterizados por cefaleia, síncope, dor torácica atípica, eritromelalgia (queimação de mãos ou pés associada a rubor e calor) são observados em cerca de 40% dos casos.
LNC	Rara	A incidência, assim como a etiologia, é desconhecida. Afeta indivíduos idosos. Ocorre esplenomegalia, hepatomegalia e sangramento mucoso ou de trato gastrointestinal. É uma doença de curso clínico lentamente progressivo.
LEC-NE	9 homens: 1 mulher acometida	Cerca de 10% dos pacientes são diagnosticados ao acaso, pois são assintomáticos. Sintomas como febre, fadiga, tosse, angioedema, dores musculares, prurido e diarreia são frequentes. A anemia, trombocitopenia, ulceração de mucosas, fibrose endomiocárdica e esplenomegalia também são comuns. Neuropatia periférica, disfunção de sistema nervoso central e sintomas pulmonares também podem estar presentes.

Fonte: Chauffaille, M.L. Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia, v.32, nº 4, São Paulo, 2010.

Dentre as características comuns, a PV é caracterizada principalmente por um aumento na produção de eritrócitos, a TE por excessiva produção de plaquetas, enquanto que a MFP é decorrente de uma alteração morfológica de megacariócitos, além do desenvolvimento de monócitos que conduz à secreção de fatores angiogênicos responsáveis por promover a fibrose na medula óssea (QUINTÁS-CARDAMA, 2013).

Trabalhos publicados a partir de 2005 sugeriram além de mutações no gene Janus kinase 2 (*JAK2*), outras mutações em genes candidatos, tais como Virus da Leucemia Mieloproliferativa (*MPL*), o qual é um membro da família de oncogenes *TET 2 (TET2)*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH* e *IKZF1*, todos identificados dentro do grupo das neoplasias BCR-ABL negativas. Mutações nos genes codificadores de *JAK2* e *MPL* parecem exercer maior efeito e são mais associados com a PV, TE e MFP, com frequências respectivamente em torno de, 95%, 55% e 60% para *JAK2* e 0, 3 e 10% para *MPL*. A incidência de mutações nos genes *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH* e *IKZF1* em NMPs possuem uma taxa de 0 a 17% (TEFFERI, 2010; FREITAS, SANTOS e MARANDUBA, 2013).

As consequências funcionais dessas mutações em NMPs incluem desregulação na via de sinalização JAK-STAT, modulação epigenética de transcrição e acúmulo anormal de oncoproteínas. No entanto, ainda não está claro como todas essas anormalidades contribuem para iniciar a doença e a evolução clonal das células (TEFFERI, 2010; FREITAS, SANTOS e MARANDUBA, 2013).

2.1.1 PATOGÊNESE DAS NMPs

Na literatura, algumas evidências sugerem que as características fenotípicas observadas nas NMPs são ocasionadas devido a desordens no processo de sinalização celular hematopoética. Já foi relatado que progenitores hematopoéticos são hipersensíveis a vários fatores de crescimento na PV, MFP e na TE (AXELRAD *et al.*, 2000), e que a mieloproliferação anormal em pacientes com NMPs surgem da ativação constitutiva das vias de transdução de sinais, ocasionadas por rearranjos genéticos ou mutações que afetam proteínas tirosino quinases ou moléculas

relacionadas (RÖDER *et al.*, 2001). Com base nessas e em outras evidências, alguns grupos de pesquisadores começaram a trabalhar com a hipótese de que alterações na função da proteína Janus kinase 2 (JAK2) poderiam estar relacionadas às NMPs, uma vez que essa proteína é a principal responsável pela ativação de várias moléculas envolvidas nos processos de sinalização celular e produção de eritrócitos (KAUSHANSKY, 2005, 2007).

2.1.2 O GENE *JANUS KINASE 2 (JAK2)*

O gene *JAK2*, mapeado no cromossomo 9p24 em humanos, inclui 25 éxons que codificam uma proteína com cerca de 1.132 aminoácidos. Essa proteína foi denominada como JAK2 e é membro da família *Janus kinase (JAK)* sendo que, até o momento, foram identificados quatro membros desta família: *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* e *Tyk2* (YAMAOKA *et al.*, 2004).

Em 2005, a descoberta da mutação na JAK2 (JAK2 V617F) permitiu expandir o conhecimento sobre a patogênese das BCR-ABL negativas. Foi identificado no éxon 14 do gene *JAK2* uma mutação de sentido trocado (*missense*), ocorrendo na posição g.1849 uma transversão de Guanina para Timina (g.1849 G>T). Essa mutação resulta na substituição do aminoácido Valina por Fenilalanina na posição p.617, afetando o domínio pseudoquinase (JH2) da proteína. A mutação JAK2 V617F está presente na maioria dos pacientes com PV e em um subgrupo de pacientes com TE e MFP (~95% em PV, 50%-70% em TE e 40%-60% em MFP) (DUNNEN e ANTONARAKIS, 2000; SPIVAK *et al.*, 2003; KAUSHANSKY, 2007; VANNUCCHI *et al.*, 2007; TEFFERI, 2008; JONES *et al.*, 2009; VAINCHENKER *et al.*, 2011).

Após a descoberta da mutação, tornou-se claro que essa anormalidade molecular poderia ser usada como marcador clonal para o diagnóstico de NMPs (FINAZZI e BARBUI, 2007; PASSAMONTI *et al.*, 2012). O impacto da descoberta da mutação JAK2 V617F foi principalmente para o diagnóstico em PV, pois antes dessa associação, o principal problema no diagnóstico era relacionado a outras doenças que também causavam eritrocitoses (KIM, HADDAD e ATALLAH, 2012).

A mutação JAK2 V617F tem mostrado induzir instabilidade genética na expressão gênica através de modificações na estrutura da cromatina e na redução da resposta apoptótica aos danos do DNA, mecanismos que podem aumentar o acúmulo de lesões genéticas levando a transformações malignas (KILADJIAN, 2012). Geron *et al.* (2008) mostraram em estudo que, ratos letalmente irradiados transplantados com células JAK2 V617F, desenvolveram uma patologia semelhante à PV que progrediu para mielofibrose de uma maneira análoga a PV humana.

Além da mutação g.1849 G>T (p.V617F) localizada no éxon 14 do gene *JAK2*, em 2007 foram encontradas no éxon 12 outras mutações: p.N542-543del, p.E543-D544del, p.K539L, p.F537-K539delinsL, p.H538-p.K539delinsL, p.H538QK539L, p.V536-1546dup11, p.F537-1546dup10+F547L, p.R541-E543delinsK e p.I540-E543delinsMK (CAZZOLA, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2007; LAUGHLIN *et al.*, 2010), possuindo frequências mais baixas, correspondendo a 3% - 4% dos casos de PV e sua pesquisa se justifica não apenas devido à ausência da mutação no éxon 14, mas também em casos de eritrocitoses e em casos em que há níveis de eritropoetina baixa, havendo técnicas válidas para sua detecção (KJAER *et al.*, 2012).

2.1.3 A PROTEÍNA JAK2

Estruturalmente, as JAK podem ser divididas em duas partes. A parte amino terminal (N-terminal) que é importante para a ligação aos receptores e possui funções estabilizadoras de superfície; e a parte carboxila terminal (C-terminal) que apresentam os domínios quinases que são cruciais para a regulação do processo de sinalização celular (SAHARINEN, VIHINEN e SILVENNOINEN, 2002).

Os membros de proteínas pertencentes à família JAK2 possuem sete domínios homólogos (JH), denominados de 1 a 7 (Figura 1).

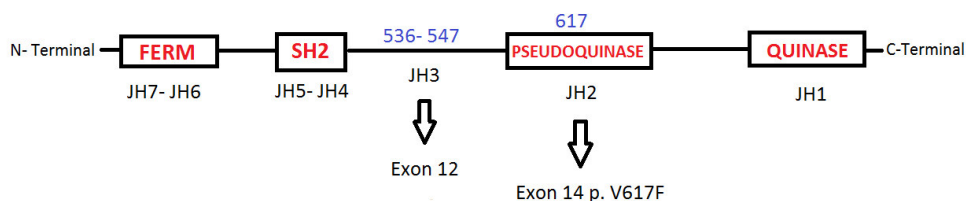


FIGURA 1: Mutações identificadas no gene *JAK2* até o presente momento e mostradas ao longo dos domínios da proteína *JAK2*. Fonte: Adaptado de Smith e Fan, 2008.

Os domínios JH1 e JH2 exercem as funções mais importantes das JAK, sendo que, o domínio JH1 atua como um domínio quinase, que contém a região de ligação ao Adenosina Trifosfato (ATP) e de ativação da via de sinalização. O JH2 é um domínio pseudoquinase, sendo homólogo ao domínio JH1, cuja atividade catalítica está ausente devido à substituição de um resíduo de Aspartato no *loop* catalítico (motivo HRD) da proteína. O JH2 tem a função inibitória e regula tanto a atividade basal das JAK como a ativação induzida por citocinas da função catalítica por interagir com o sítio ativo JH1, bloqueando o ATP e/ou substratos de se ligarem ao catalisador local (SAHARINEN, VIHINEN e SILVENNOINEN, 2003; GOLDMAN, 2005; SCHAFFER, 2006; SMITH e FAN, 2008; UNGUREANU *et al.*, 2011).

As regiões JH3-JH7, que compreendem o domínio SH2 e o domínio FERM (*Four-Point-One, Ezrin, Radixin, Moesin*) interagem no domínio citoplasmático do receptor de citocina na superfície celular (MCLORNAN, PERCY e McMULIIN, 2006; DUSA *et al.*, 2008; SMITH e FAN, 2008). Em *JAK2*, os domínios JH3-JH7 são necessários para a expressão do receptor de eritropoetina (EPO-R), citocina que controla a eritropoese na medula óssea. Há hipóteses de que o domínio JH7 da *JAK2* seja o principal sítio de interações específicas com o EPO-R e que o domínio JH3 é conformacionalmente importante para a orientação do JH7 (HUANG, CONSTANTINESCU e LODISH, 2001). Mutações no domínio JH2 das *JAK1*, *JAK3* e *TYR2* também levam à ativação constitutiva da proteína (SAHARINEN *et al.*, 2003).

Como já mencionado, em casos de PV *JAK2* V617F negativos, diferentes mutações de ganho de função no éxon 12 de *JAK2* foram descritas. Essas mutações abrangem a região de ligação entre os domínios SH2 e JH2. Apesar de não estarem diretamente localizadas no domínio JH2, essas mutações podem modificar a

estrutura do domínio pseudoquinase induzindo uma hipersensibilidade à eritropoetina de uma maneira muito semelhante à ocasionada pela mutação p.V617F (LAKEY *et al.*, 2010; VAINCHERKER *et al.*, 2011; IKEGA, OGAWA e TAKEISHI, 2012).

2.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO JAK-STAT

2.2.1 OS RECEPTORES DE SINALIZAÇÃO

As citocinas do sistema hematopoético incluem interleucinas (IL), fatores estimulantes de colônias (CGF), interferon (INF), eritropoetina (EPO) e trombopoetina (TPO) que ativam a transdução de sinal da via de sinalização JAK-STAT. As citocinas têm um papel essencial no desenvolvimento, diferenciação e função das células mielóides e linfóides (YOSHIMURA, NAKA e KUBO, 2007; TAMIYA *et al.*, 2011).

A maioria desses receptores faz parte de uma família de receptores homodímeros tipo I, entre eles, os receptores de eritropoetina (EPO-R) e de trombopoetina (TPO-R) (Figura 2) (MORGAN e GILLILAND, 2007).

O receptor tipo I é expresso especificamente durante a diferenciação mielóide e eritróide, podendo explicar a atividade preferencial da JAK2 V617F em células da linhagem mielóide, e não na linhagem linfóide que não possui este tipo de receptor (MORGAN e GILLILAND, 2007).

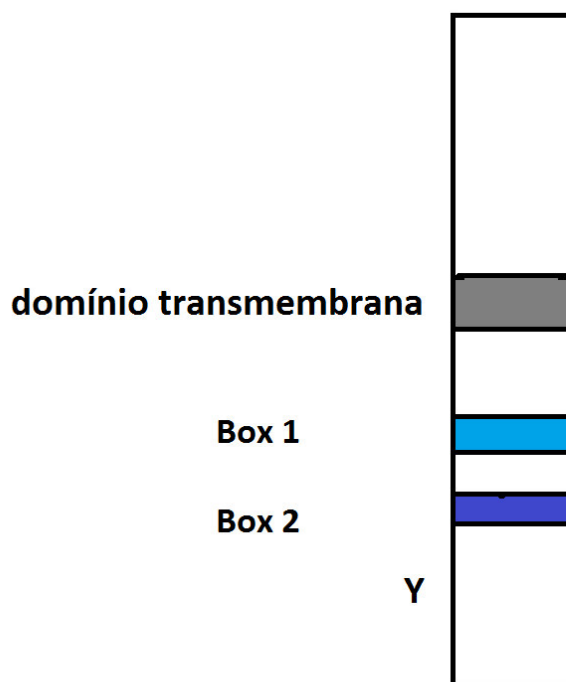


FIGURA 2: Estrutura de um receptor tipo I. Em tonalidades de azul, os sítios *Box1* e *Box2*, que constituem sítios de ligação a JAK. O sítio Y é alvo de fosforilação. Fonte: Rawlings, Rosler e Harrison, 2004.

As JAK2 estão sempre associadas com receptores de citocinas por meio da ligação mediada entre a interação do domínio FERM da JAK2 e a região *Box1* da membrana proximal intracitoplasmática do receptor (KHWAJA, 2006; CONSTANTINESCU, GIRARDOT e PECQUET, 2007).

Mutações no domínio JH2 ou em sub-regiões desse domínio podem resultar em um aumento na atividade basal das JAK2 e JAK3. No entanto, deleções podem impedir a resposta ao estímulo por citocinas em JAK indicando que, mesmo na presença de um ligante, a JAK2 é auto inibida por uma interação intracelular entre os domínios JH2 e JH1 (UNGUREANU *et al.*, 2011; GÄBER, BEHRMANN e HANN, 2013).

A intensidade e a duração dos sinais nos receptores de citocinas são rigidamente controlados por vários mecanismos de regulação para evitar uma sinalização excessiva e anormal das células que poderia levar a distúrbios autoimunes ou transformações malignas. Essa sinalização é regulada em vários níveis: pela ação de fosfotirosina fosfatases, por inibidores de proteínas STAT - (PIAS do inglês *Protein inhibitors of activated STAT*) e pela expressão de proteínas membros da família SOCS.

2.2.2 O FUNCIONAMENTO DAS JAK

As JAK estão associadas às porções intracelulares de receptores de citocinas, com atividade quinase intrínseca, mediada pelos seus domínios FERM e SH2, sendo mantidas em um estado inativo na ausência de ligantes específicos que ativam o receptor (TAN, WESTERMAN e DOBROVIC, 2007; GARI, 2009). Normalmente, a JAK2 é ativada em resposta a uma variedade de citocinas como (IL-3), (GM-CSF), (TPO), (EPO), (IL-5) (WALZ *et al.*, 2008).

A ligação da citocina leva a uma alteração conformacional do receptor que são transmitidas as JAK associadas citoplasmaticamente, ocasionando a ativação e fosforilação. A fosforilação dos resíduos de tirosina nas JAK atua como locais de ancoragem aos sítios SH2 das moléculas sinalizadoras que contém esse domínio. Mutações no gene *JAK2* gera uma ativação constitutiva da via JAK-STAT, principalmente entre STAT3 e STAT5. Além de mutações do tipo *hot spot*, a ativação constitutiva em tirosino quinases ocorre também por translocação cromossomal, deleção, duplicação em *tandem*, que são frequentes em eventos patogênicos em malignidades hematopoéticas (LU *et al.*, 2005; WALZ *et al.*, 2008; TAMIYA *et al.*, 2011; UNGUREANU *et al.*, 2011; GÄBER, BEHRMANN e HANN, 2013).

As STAT localizam-se no citosol e migram para o núcleo regulando a transcrição gênica somente após serem ativadas. Uma vez associadas aos sítios fosforilados das JAK essas STAT tornam-se também fosforiladas e dimerizadas (SMITH e FAN, 2008).

As STAT dimerizadas migram para o núcleo, onde agem como fatores de transcrição. Deste modo, elas ativam ou reprimem sequências gênicas que são importantes para a proliferação e sobrevivência celular. Entre essas sequências, podemos destacar genes que especificam ciclinas e genes que codificam proteínas antiapoptóticas (FISKUS *et al.*, 2012). Os dímeros de STAT ativam também genes que codificam proteínas inibidoras que ajudam na finalização da resposta celular. Algumas dessas proteínas se ligam às JAK fosforiladas, inativando-as, bem como os seus receptores associados; outras se ligam aos dímeros de STAT fosforiladas e as impedem de se ligar à sequência gênica alvo.

A permanência do estado fosforilado das STAT parece ser principalmente

importante para a retenção de uma proteína STAT no núcleo da célula tempo suficiente para iniciar a transcrição. Posteriormente, as STAT são desfosforiladas por várias fosfatases e degradadas pela via ubiquitina. Esta é uma via proteolítica que difere das demais devido ao seu grande consumo de ATP. A via se inicia com a ubiquitinação da proteína alvo. Há cinco alvos principais da ubiquitina: (1) receptores celulares da membrana celular, (2) moduladores de crescimento e supressores de tumor, (3) ativadores e inibidores de transcrição, (4) reguladores do ciclo celular e (5) proteínas mutantes ou danificadas. Este último caso, é especialmente frequente, com até 30% das proteínas recém-sintetizadas de uma célula sendo quebradas via proteossomos por não terem sido aprovadas pelo rigoroso controle celular (HARICHARAN e LI, 2013).

Entre as principais STAT envolvidas está a STAT5, que entre outras funções, influencia diretamente a expressão do gene *JAK2* e regula positivamente a produção de proteínas antiapoptóticas Bcl-XL, que são constitutivamente expressas em progenitores eritróides de pacientes com PV (KOTA, CACERES e CONSTANTINESCU, 2008; GODFREY e GREEN, 2012; KOOPMANS *et al.*, 2012). Estudos revelaram que mutações em outros oncogenes alteram a via de sinalização JAK-STAT frequentemente em pacientes JAK2 V617F negativos, enfatizando o papel dessa via na patogênese das NMPs (OLCAYDU *et al.*, 2011).

A via JAK-STAT também interage com as vias de sinalização RAS/MAPK e PI-3K/Akt. Vale a pena ressaltar a importância dessas moléculas na regulação *downstream* da via JAK-STAT por atuar principalmente em outras proteínas antiapoptóticas da família Bcl2, bloqueando a apoptose de células danificadas e assim promovendo a sobrevivência e multiplicação celular (STEELMAN *et al.*, 2008; COKIC *et al.*, 2012).

Mecanismos de controle da sinalização mediada pela via JAK-STAT, incluem a desfosforilação das JAK e STAT, através da inibição por proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS), LNK (também conhecido como SH2B3) e CBL (Linfoma Casitas de linhagem B) (YOSHIMURA *et al.*, 2007; MORGAN e GILLILAND, 2008).

2.2.3 REGULADORES NEGATIVOS DA VIA JAK-STAT

Com o avanço do entendimento sobre a via JAK-STAT, importantes mecanismos para a regulação negativa dessa via também foram estudados, incluindo proteínas tirosino fosfatases ou a inibição de fatores STAT de se ligarem ao DNA alvo devido à presença de proteínas inibitórias de STAT ativadas (PIAS). Entre as PIAS, iremos abordar sobre as proteínas SOCS, CBL e LNB.

As proteínas SOCS correspondem a uma família de supressores da sinalização de citocinas da via JAK-STAT, caracterizadas pela presença de um domínio amino-terminal de tamanho variável contendo um domínio inibitório, um domínio homólogo SRC conservado 2 (SH2) e outro domínio na porção carboxila-terminal chamado SOCS *Box* (Figura 3). Atualmente existem oito membros nessa família – SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 e CIS. Normalmente são expressas em baixos níveis em células não estimuladas, tendo sua expressão aumentada quando as STAT encontram-se ativadas (YOSHIMURA, NAKA e KUBO, 2007; TAMIYA *et al.*, 2011).



FIGURA 3: Estrutura das proteínas SOCS. Fonte: Adaptado de Khwaja, 2008.

As SOCS podem inibir a sinalização JAK-STAT por dois mecanismos: (1) pela inibição da atividade quinase da JAK2 competindo com os domínios SH2 das STAT por sítios de ligação no domínio citoplasmático do receptor ou (2) por facilitar a degradação proteossomal de proteínas de sinalização, se ligando ao domínio JH1 da JAK2, impedindo de ocorrer a ativação das demais vias associadas à JAK-STAT. As SOCS3 se ligam ao EPO-R por meio do domínio SH2. A habilidade das SOCS3 em interagir tanto com o EPO-R como com a JAK2 pode aumentar esse efeito inibitório na via de sinalização da EPO (HOOKHAM *et al.*, 2007).

Hookham *et al.* (2007) mostraram que a SOCS3 foi incapaz de regular a sinalização da EPO na presença de mutações em JAK2. Assim, a proliferação em células expressando JAK2 V617F não foi bloqueada e de fato o crescimento foi estimulado, sugerindo que a SOCS3 pode potencializar a sua ativação e contribuir para a patogênese das doenças na presença da mutação. Em contrapartida, as SOCS1 e SOCS2 foram degradadas na presença de mutações no gene *JAK2*.

Algumas mutações nas diferentes SOCS foram encontradas em NMPs, mas aparecem bem raramente. A hipermetilação de ilhas CpG em SOCS1 e SOCS3 estão associadas com uma diminuição na expressão desses reguladores em pacientes p.V617F positivos de PV e TE (GÄBER, BEHRMANN e HANN, 2013).

Outro componente importante desse complexo de regulação negativa são proteínas multifuncionais com atividade ubiquitina-ligase – CBL. As CBL são usualmente envolvidas no *feedback* negativo de receptores tirosino quinases por bloqueio competitivo da sinalização. Elas induzem a degradação proteossomal das tirosino quinases ativadas por ubiquitinação. Todas as proteínas CBL têm um único domínio que reconhece resíduos de tirosina fosforilados que estão presentes em tirosino quinases ativadas (NARAMURA *et al.*, 2011; GÄBER, BEHRMANN e HANN, 2013).

As LNK, membro da família de proteínas SH2B, constituem proteínas com regiões ricas em prolina, um domínio PH e um domínio SH2, que regula negativamente a atividade da JAK2 pela ligação com a tirosina fosforilada através do domínio SH2. Atua também regulando a sinalização do TPO-R e EPO-R, sendo detectada em pacientes JAK2 V617F positivos e negativos (GÄBER, BEHRMANN e HANN, 2013). A perda ou alteração em LNK acelera o desenvolvimento de NMPs induzidas por JAK2 V617F em modelos murinos. Segundo Gäber *et al.* (2013) a frequência de mutações em LNK é baixa. No entanto, outras mutações nesse regulador foram identificadas em transformações leucêmicas de NMPs em uma frequência de aproximadamente 13% e algumas outras mutações foram associadas com a mutação p.V617F, embora não se sabe se os mutantes para LNK e V617F estavam presentes nas mesmas células. A deficiência aumentada em LNK aumenta a capacidade oncogênica de JAK2 para a expansão de progenitores mielóides *in vitro* e *in vivo* (JIANG *et al.*, 2012).

A figura abaixo traz mutações identificadas em alguns genes associados à via JAK-STAT que estão relacionados à PV, TE e MFP.

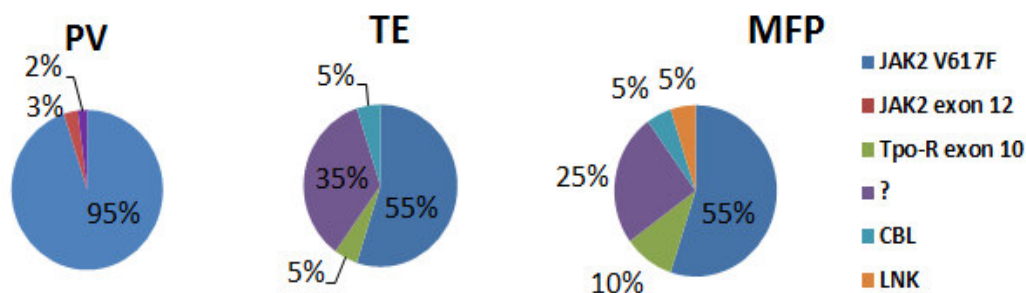


FIGURA 4: Proporção de pacientes com PV, TE e MFP com diferentes anormalidades genéticas associadas à via JAK-STAT. Fonte: Gäber *et al.*, 2013.

2.2.4 A MUTAÇÃO NO GENE *JAK2* E A ALTERAÇÃO NO FUNCIONAMENTO DA PROTEÍNA

Quando ocorre uma mutação no gene *JAK2* (éxon 14 – V617F ou no éxon 12) o domínio pseudoquinase JH2 da proteína sofre uma alteração, interagindo com o domínio quinase JH1, bloqueando o acesso de ATP e de outros substratos para o catalisador local, deixando a proteína em um estado constitutivamente ativado, mesmo na ausência de EPO. Desta maneira, a *JAK2* permanece sempre fosforilada e conseqüentemente, as STAT são mantidas no mesmo estado, atuando em seqüências gênicas específicas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento, crescimento e sobrevivência das células hematopoéticas. Além de ativar a via JAK-STAT, a mutação p.V617F ativa também de modo constitutivo as vias RAS/MAPK e PI3K/Akt, que levam a uma expressão de proteínas mitóticas, proteínas regulatórias do ciclo celular (ciclina D1 e Cdc 25A) e genes antiapoptóticos (*Bcl-XL* e *Bcl2*). Essas anormalidades envolvendo não apenas a via JAK-STAT como as demais citadas, resulta no avanço proliferativo das células afetadas (Figura 5) (GÄBER, BEHRMANN e HANN, 2013).

Em células mutadas, a regulação negativa torna-se inadequada e/ou

ineficiente, sendo que normalmente os domínios SH2 presentes em proteínas PIAS não conseguem desfosforilar as proteínas JAK2. Além disso, os mecanismos antiapoptóticos estão sendo expressos em níveis muito mais elevados do que o normal. Uma mutação adquirida em uma dessas proteínas regulatórias pode produzir por si mesma uma ativação exagerada de STAT, também na ausência de mutações específicas em JAK2 (RAWLINGS, ROSLER e HARRISON, 2004).

Em estudo realizado por Teofili *et al.* (2008), avaliaram o estado de metilação de SOCS1, SOCS2 e SOCS3 nas ilhas CpG de pacientes com PV e TE. Dos 31 pacientes com PV, 22 possuíam mutação JAK2 V617F positiva e nenhum apresentou mutação no éxon 12. No entanto, desses 31, 10 apresentaram hipermetilação em SOCS1 e SOCS3, sendo maior a frequência em SOCS3. Com estes resultados, o grupo demonstrou que pacientes com PV e TE apresentam a regulação negativa controlada por proteínas SOCS na via JAK-STAT frequentemente alterada, determinando uma insuficiência funcional na transcrição gênica (YOSHIMURA, NAKA e KUBO, 2007; TEOFILI *et al.*, 2008).

Eventos moleculares adicionais parecem interferir na atividade da JAK2 como a citogenética, que aumenta a atividade quinase da proteína, a capacidade de regulação das fosforilases e proteínas SOCS, polimorfismos e mutação em receptores de citocinas (PERROTTA *et al.*, 2010).

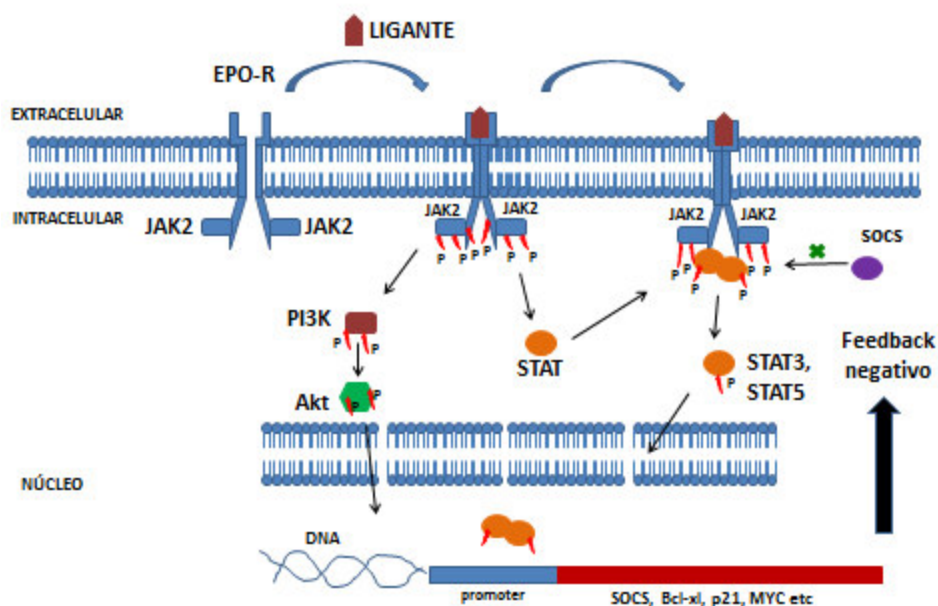


FIGURA 5: Esquema das vias de sinalização ativadas por uma citocina ao se ligar no receptor. As PI3K, Akt e STAT são fosforiladas após a fosforilação das JAK2. O *feedback* negativo ativa as proteínas regulatórias negativas para finalizar a ativação das vias. No entanto, mediante a mutação no domínio JH2 da proteína JAK2 esse controle é ineficiente. Fonte: A autora, 2014.

2.3 A POLICITEMIA VERA

A PV se origina de uma alteração nas células-tronco hematopoéticas multipotentes causando acúmulo de eritrócitos, leucócitos e plaquetas morfolologicamente normais independente de EPO, podendo apresentar leucocitose, trombocitose, esplenomegalia e risco aumentado de eventos trombóticos (MODAN, 1965; TEFFERI *et al.*, 2009; PASSAMONTI *et al.*, 2012). Estudos citogenéticos da medula óssea são normais na maioria dos pacientes embora seja observado deleções 20q e trissomia dos cromossomos 8 ou 9, em 20 a 30% dos pacientes (BENCH *et al.*, 2005; WILLIAMS, 2007). A incidência global de PV é de 0,7-2,6 casos a cada 100.000 habitantes/ano, aumentando com a idade dos pacientes, independente do sexo (KIM, HADDAD e ATALLAH, 2012).

Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1892 por Louis Henri Vaquez,

que considerou a PV como uma desordem cardíaca congênita, mas no primeiro exame *post-mortem* não identificaram anormalidades cardíacas e sim, um aumento acentuado do baço e do fígado. Vaquez suspeitou que o aumento das hemácias fosse devido a uma hiperatividade hematopoética (GOLDMAN, 2005; TEFFERI, 2008). Em 1895, William Osler apresentou quatro pacientes com PV, onde dois desses estavam com esplenomegalia. Essa informação deu crédito a Vaquez pela descrição anterior (GOLDMAN, 2005).

Prchal e Axelrad (1974) demonstraram que as células progenitoras hematopoéticas de pacientes com PV formavam colônias *in vitro* na ausência de citocinas (KILPIVAARA e LEVINE, 2008). Estudos subsequentes mostraram que células progenitoras eritróides e mielóides desses pacientes são hipersensíveis a diferentes fatores de crescimento e que anormalidades similares estão presentes em uma proporção de pacientes com TE e MFP (BAXTER *et al.*, 2005).

Esta neoplasia apresenta praticamente a mesma incidência em homens e mulheres, sendo mais comum na faixa etária dos 60 anos, contudo pode se manifestar mais cedo. O paciente diagnosticado com PV pode ainda apresentar pletora, prurido, cefaleia, tonturas, zumbidos, cansaço ou fraqueza (TEFFERI *et al.*, 2009; KIM, HADDAD e ATALLAH, 2012). No entanto, a falta de especificidade dos sintomas pode contribuir para uma falha no diagnóstico.

O curso clínico da doença pode ser dividido em três fases: (1) a fase pré-policitemica, caracterizada por uma eritrocitose leve ou limítrofe, muitas vezes combinada com trombocitose significativa, por vezes associada a eventos trombóticos; (2) a fase policitemica aparente e (3) a fase pós- policitemica, definida por citopenia, incluindo anemia, fibrose da medula óssea e hematopoese extramedular. Quase todos os pacientes são diagnosticados quando se encontram na fase mais sintomática da doença (GÄBER, BEHRMANN e HANN, 2013).

O diagnóstico de PV requer a integração de manifestações clínicas e resultados laboratoriais, biópsia de medula óssea e análise molecular da proteína JAK2 (LAKEY *et al.*, 2010).

Em PV, a homozigose dos alelos para a mutação JAK2 V617F ocorre em 30% desses pacientes, havendo perda da heterozigose (LOH), sendo raro em pacientes com TE e MFP, o que sugere que a dose dupla da mutação favoreça o aumento da sinalização para a proliferação de clones homozigóticos (SCOTT,

CAMPBELL e GREEN, 2006; JAMES, 2008; RICE *et al.*, 2011). A mutação é detectada tanto em homozigose como em heterozigose, mas estudos realizados por Scott *et al.* (2006) apontam que a homozigose torna-se predominante em alguns casos de PV, pois parte dos progenitores hematopoéticos de pacientes heterozigóticos abrigariam células homozigóticas para a mutação. Seguindo ainda essa hipótese, as células homozigóticas mutadas adquiririam uma vantagem proliferativa em relação às demais células. Assim, elas ocupariam uma grande proporção das células-tronco na medula óssea (SCOTT, CAMPBELL e GREEN, 2006; SCOTT e REBEL, 2012).

O curso clínico da PV pode evoluir para outras doenças malignas com características mais agressivas e de menor sobrevida, como a Mielofibrose e a Leucemia Mieloide Aguda (LMA). De acordo com alguns estudos, o risco de um paciente com PV desenvolver MFP é aproximadamente 10% a 20%, já para o desenvolvimento da LMA o risco é de 1,5%. Entre as principais causas de morbimortalidade na PV está os eventos tromboembólicos (VIANELLO *et al.*, 2011).

O tratamento de escolha consiste em flebotomias (método de sangria) com o objetivo de manter o hematócrito abaixo dos níveis de referência (< 45 em homens e < 42 em mulheres). Além da flebotomia, também são utilizados medicamentos citorrredutores, como a hidroxiuréia que permanece o agente mielossupressor de primeira escolha (FINAZZI e BARBUI, 2007).

2.4 QUESTIONAMENTOS ACERCA DOS DIFERENTES FENÓTIPOS EM NMP BCR-ABL NEGATIVAS E A MUTAÇÃO JAK2 V617F

Uma questão ainda intrigante para os pesquisadores, em relação às NMP, é como uma mesma mutação pode desencadear três doenças fenotipicamente diferentes. Ainda não há uma compreensão clara sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo. O que existe são hipóteses. Uma delas é a hipótese da dose-gênica, que está associada com carga alélica. Outra, é que possa haver alterações epigenéticas que predispõe o organismo do paciente a desenvolver determinada NMP, bem como alteração nos níveis de expressão de genes

específicos ao desenvolvimento de malignidades e mutações em outras vias de sinalização que vão alterar a sinalização das proteínas regulatórias (FREITAS, SANTOS e MARANDUBA, 2013).

Para James (2008), Kralovics *et al.* (2008), Plo *et al.* (2008), Smith e Fan (2008), Score e Cross (2012) e Pagliarini (2013), o fenótipo da doença está relacionado ao conceito de carga alélica, isto é, a relação entre o número de alelo tipo selvagem e alelo tipo mutante presentes na célula. Assim, baixos níveis de alelos mutantes estariam relacionados com o fenótipo de TE, enquanto que maiores níveis de alelos mutados conduziriam a um fenótipo semelhante a PV. Esses maiores níveis de alelos mutados em células-tronco hematopoéticas estariam relacionados ao caráter homozigótico dos pacientes, ocasionado pela perda da heterozigose (LOH) utilizando a teoria da dissomia uniparental. A recombinação entre cromátides homólogas pode ocorrer na mitose, quando segmentos de cromossomos homólogos se pareiam de maneira acidental em células somáticas, resultando em uma célula com os dois cromossomos herdados de um mesmo parental. Embora seja um evento raro, parece constituir uma maneira importante de possibilitar que mutações recessivas associadas ao câncer apareçam e que no caso da PV possam gerar uma alta frequência de perda da heterozigose (Scott e Rebel, 2012).

Presume-se que a homozigose confira uma vantagem proliferativa em relação às demais células, que possuem apenas um alelo mutado, aumentando o nível de atividade da tirosina quinase gerada pela proteína JAK2 mutada. Pacientes com TE e MFP muito dificilmente possuem caráter homozigótico, sendo mais comum a heterozigose (Scott e Rebel, 2012).

Além da associação entre homozigose/heterozigose com o fenótipo, há outras hipóteses que tentam correlacionar os diferentes fenótipos com a mutação JAK2 V617F.

James (2008) sugere que uma mesma mutação pode ocorrer nas células-tronco hematopoéticas de todos os pacientes com NMP, mas de acordo com heranças genéticas de cada paciente, o fenótipo pode ser diferente e levar ao desenvolvimento de uma determinada NMP. A mutação JAK2 V617F também pode ser considerada um evento secundário a um evento pré-JAK2 ainda não conhecido, que irá determinar o fenótipo da NMP. Esse primeiro evento molecular seria

diferente, dependendo da doença, o que explicaria os diferentes fenótipos. Existem alguns argumentos que corroboram com essa hipótese. A observação de casos familiares de NMP é a evidencia mais notável da presença de um evento pré-JAK2 em alguns pacientes. A primeira característica considerada é a ocorrência de NMP diferentes dentro de uma mesma família. Isto sugere a presença de um evento germinal desconhecido que seria um fator predisponente comum às NMP.

Em estudo, Plo *et al.* (2008), discute também a hipótese dose-gênica, que postula que a mutação JAK2 pode ser um ponto de início para as três patologias, e a ocorrência de outros eventos genéticos, que podem modificar a atividade quinase JAK2 podem explicar a heterogeneidade acerca das NMP clássicas. Vários mecanismos têm sido propostos para auxiliar o entendimento da perda da heterozigose e/ou a aquisição de novas anormalidades genéticas, incluindo mecanismos de reparo da quebra de DNA de fita dupla, a recombinação homóloga e mecanismos de junção da porção final de DNA não homólogos. Todos levam a uma instabilidade genômica, sendo a regulação precisa desses mecanismos essenciais para a manutenção, estabilidade e diversidade do genoma (JAMES, 2008; KILPIVAARA e LEVINE, 2008; SMITH e FAN, 2008 ; PASSAMONTI e RUMI, 2009; SHIH *et al.*, 2012).

No entanto, um estudo relatou que polimorfismos na via de sinalização JAK-STAT podem causar algumas variabilidades fenotípicas e fornecem evidências de que fatores constitutivos contribuem para o fenótipo em pacientes com NMP (KRALOVICS, 2008).

Segundo Mascarenhas *et al.* (2011), eventos biológicos que levam ao início e progressão das NMP estão ligadas não somente a aquisição de mutações genéticas, como a JAK2 V617F, mas também devido à alterações epigenéticas que não afetam a sequência primária do DNA, mas afetam a expressão gênica na remodelagem da cromatina. A desregulação dos processos de modulação entre os nucleossomos podem resultar no silenciamento de genes supressores de tumor e genes de diferenciação, promovendo a sobrevivência celular por bloquear a apoptose e a senescência, contribuindo para uma transformação maligna. O pesquisador aponta ainda, duas categorias de alterações epigenéticas em NMP: (1) alterações nos genes que codificam proteínas envolvidas na remodelagem da estrutura da cromatina, como os genes *TET2*, *ASXL-1*, *JAK2*, entre outros e (2)

alteração no sítio promotor de genes necessários à sobrevivência, diferenciação e proliferação celular.

A mutação JAK2 V617F além do papel de sinalização influencia a estrutura da cromatina bloqueando também o recrutamento de proteínas repressoras (VAINCHENKER *et al.*, 2011).

2.5 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento deste projeto permite a implantação de um serviço de diagnóstico molecular para doenças genéticas, principalmente para Policitemia Vera, dispondo o Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora equipamentos e reagentes disponíveis para a execução dos trabalhos. A padronização da técnica foi feita a fim de oferecer o serviço molecular na Instituição.

Em colaboração com os médicos do Setor de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora e Hospital ASCOMCER, estabelecemos como meta inicial detectar mutações no gene *JAK2* em pacientes com PV, diagnosticados clinicamente, que não possuíam o diagnóstico molecular.

Assim sendo, visamos observar a frequência de casos de PV na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, que tem aproximadamente 545.942 habitantes e estende sua área de influência em saúde a uma população de 2.000.000 de habitantes (IBGE, 2010).

3 OBJETIVOS

Investigar a frequência da mutação *JAK2* V617F em pacientes diagnosticados clinicamente com Policitemia Vera, encaminhados pelo setor de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora e Hospital ASCOMCER, incluindo a pesquisa de outras possíveis mutações, menos frequentes, no éxon 12 do gene *JAK2*, objetivando contribuir para melhorar o diagnóstico.

Observar a ocorrência de eventos trombóticos associados à PV a partir dos dados clínicos coletados dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário de Juiz de Fora, Minas Gerais, (CAAE 09109612.1.0000.5133) e parecer nº 207.573, conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO 1). Todos os pacientes que participaram desse estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2).

A investigação da mutação JAK2 V617F foi realizada em colaboração com os médicos do Setor de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário e da Associação Feminina de Prevenção e Combate ao Câncer de Juiz de Fora (Hospital ASCOMCER).

Foram atendidos 31 pacientes diagnosticados com Policitemia Vera entre os meses de março a setembro de 2013 que estavam em acompanhamento médico e tratamento no Hospital ASCOMCER. O diagnóstico clínico de PV foi realizado seguindo critérios estabelecidos pela OMS (2008) que se encontram descritos no quadro 1, onde o diagnóstico será atribuído pela presença de dois critérios maiores e um menor, ou um critério maior e dois menores (TEFFERI, 2012). Foram incluídos apenas pacientes que possuíam biópsia de medula óssea compatível com neoplasia mieloproliferativa. Cinco pacientes foram excluídos da pesquisa, pois não aceitaram participar do trabalho.

QUADRO 1: Critérios de diagnóstico para PV da Organização Mundial da Saúde, 2008.

CRITÉRIOS MAIORES	CRITÉRIOS MENORES
1) Hgb > 18.5 g/dL em Homens e Hgb > 16.5 g/dL em Mulheres	1) Biópsia da MO mostrando hiper celularidade
2) Ht > 54% em Homens e Ht > 49% em Mulheres	2) Nível de EPO anormal
3) Presença da JAK2 V617F ou JAK2 éxon 12	3) Crescimento de colônias eritroides endógenas

Fonte: Adaptado de Tefferi, 2012.

As amostras de sangue periférico foram coletadas em dois tubos a vácuo com EDTA (8 mL) após o consentimento assinado de cada paciente, e encaminhadas para o Laboratório de Genética e Setor de Aconselhamento da UFJF.

4.2 COLETAS DE DADOS

Houve o preenchimento de um questionário (ANEXO 3) contendo informações relevantes sobre o diagnóstico clínico dos paciente para auxiliar no estudo da mutação e também avaliação dos principais sinais clínicos apresentados no momento do diagnóstico. Informações sobre histórico familiar para alguma neoplasia foi levado em consideração, assim como dados apresentados em hemogramas.

4.3 METODOLOGIA

O fluxograma abaixo (figura 6) nos dá um panorama da metodologia empregada nesse estudo, iniciando com o diagnóstico clínico dos pacientes com PV até a realização das técnicas que detectam a presença de mutações no gene *JAK2*.

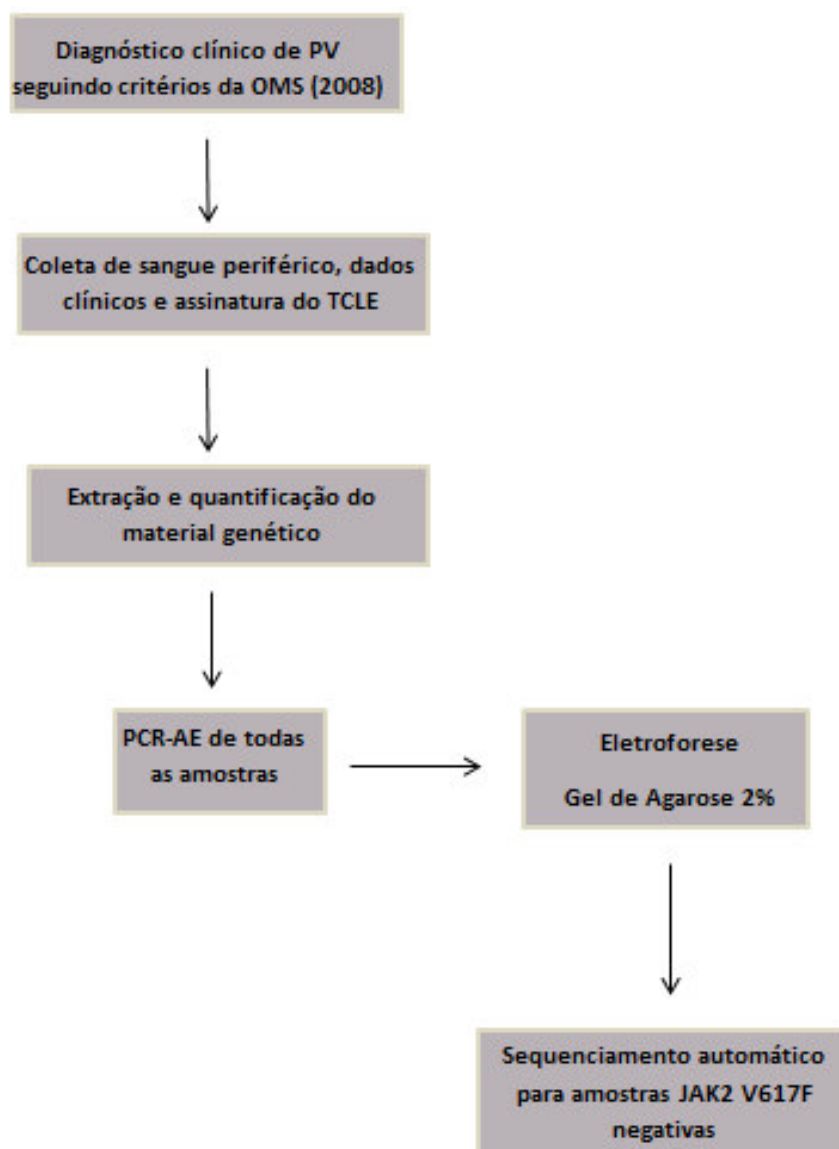


FIGURA 6: Fluxograma das etapas metodológicas. Fonte: A autora, 2014.

4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA do sangue total foram utilizadas soluções salinas preparadas no laboratório.

O volume da amostra de cada paciente foi transferido para tubos plásticos estéreis de 50 mL corretamente identificados e acrescentado 30 mL do tampão *Bloodlysis* 1X (KHCO_3 , NHCl_4 , EDTA 0,5M). As amostras foram homogeneizadas e deixadas em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a

1800 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado novamente com 15 mL do tampão para retirar traços remanescentes de sangue e centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos. Foi adicionado mais 10 mL do mesmo tampão, o *pellet* ressuspensão e centrifugado por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 3 mL do tampão *Nucleolysis* 1X (Tris-HCl, NaCl 4M, EDTA 0,5M). A seguir acrescentou-se 200 µL de proteínase K 10 mg/mL (Invitrogen®) e 300 µL de SDS 10%. A mistura foi levemente homogeneizada até que a solução ficasse viscosa e colocada no banho quente a 37°C *overnight*.

Posteriormente, acrescentamos 1 mL de NaCl 6M e as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi colocado em novos tubos de 50 mL estéril, todos devidamente identificados, e uma nova centrifugação foi realizada por 15 minutos.

O sobrenadante livre de impurezas foi coletado e transferido para tubos de vidro estéril tendo seu volume completado com etanol absoluto gelado. O tubo foi invertido gentilmente até o aparecimento do material genético. O DNA foi retirado com capilar de vidro e mergulhado rapidamente em micro tubo contendo 200 µL de álcool etílico 70%. A seguir, o DNA foi reidratado com uma solução de TE-4 (Tris-HCl, EDTA 0,5 M) e levado ao banho quente por 30 minutos. Posteriormente, foi deixado em temperatura ambiente e logo armazenado no *freezer* -20°C.

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

O material genético foi quantificado através do Nanodrop2000 (Thermo®), utilizando apenas 1µL da solução.

4.3.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE ALELO- ESPECÍFICO (PCR-AE)

Todas as amostras de DNA foram genotipadas para a mutação JAK2 V617F, localizada no éxon 14, por uma Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) Alelo-Específico (AE), conforme descrito por Baxter *et al.* (2005) (Figura 7). Foram utilizados 1 $\mu\text{mol/L}$ de um *primer reverse* comum, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ de um *primer forward* específico para o alelo mutado (gerando um produto de 203 pb), e 0.5 $\mu\text{mol/L}$ de um outro *primer forward* (Quadro 2) para controle interno das amostras que amplifica um produto de 364 pb de ambos os alelos, tipo selvagem e mutante.

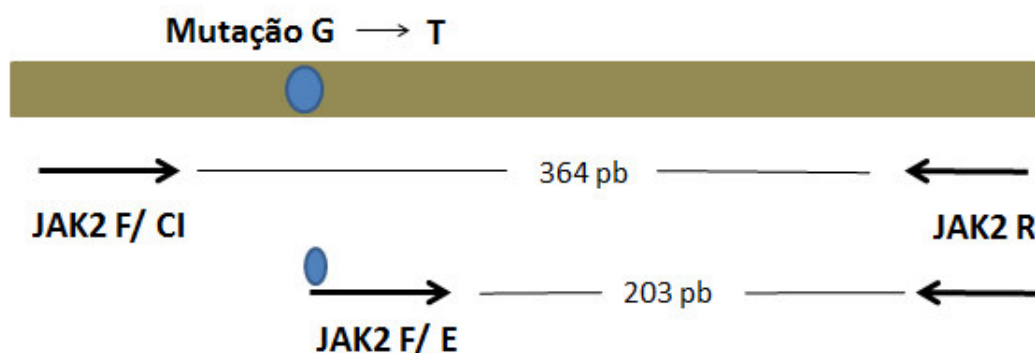


FIGURA 7: Esquema do funcionamento da PCR-AE. JAK2 F/ CI: controle interno, presente em todas as amostras analisadas; JAK2 F/ E: *primer* específico, presente apenas em amostras com a mutação V617F e JAK2 R: *primer* reverso, para ambos.

Utilizamos cerca de 50 a 100 ng de DNA, 0,2 mM de dNTP's, 1,5 mM de MgCl_2 , 1x do tampão de PCR e 1 U de Taq Polimerase (Promega®). Os parâmetros da termociclagem foram: 96° C por 2 min., seguidos de 35 ciclos a 96° C por 30 seg., 58° C por 30 seg. e 72° C por 1 min., e um único ciclo de 72° C por 10 min. Os amplicons foram analisados em gel de agarose 2%, onde os fragmentos obtidos de indivíduos saudáveis aparecem apenas na altura de 364 pb e em indivíduos com a mutação p.V617F aparecem uma banda na altura de 203 pb. Um controle interno normal foi utilizado para validar a reação.

QUADRO 2: *Primers* utilizados na PCR-AE

GENE JAK2	DIREÇÃO	SEQUÊNCIA
R	5' – 3'	CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCA
F/ E	5' – 3'	AGCATTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT
F/ CI	5' – 3'	ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG

Fonte: Baxter *et al.*, 2005.

4.3.4 DIGESTÃO ENZIMÁTICA COM Bsa XI

Os produtos gênicos obtidos por amplificação de PCR, utilizando padrões convencionais, e *primers forward* (5'-GGGTTTCCTCAGAACGTTGA-3') e *reverse* (5'-TCATTGCTTTCCTTTTTACAA-3') (SIGMA®), geram um produto amplificado de 460 pares de base (pb).

Foram utilizados 300 ng de DNA genômico de cada paciente, 0,2 mM de dNTP's, 2 mM de MgCl₂, 0,4 uM de cada *primer*, 1x do tampão de PCR e 1 U de Taq Polimerase (Promega®). Os parâmetros de termociclagem foram os mesmos utilizados na PCR-AE.

Os fragmentos amplificados, contendo 460 pb, foram submetidos a digestão enzimática com Bsa XI (BioLabs®) por 16 horas de incubação a 37^o C e analisados em gel de agarose 2%. Os alelos tipo selvagem são visualizados em três fragmentos de tamanhos diferentes: 241 pb, 189 pb e 30 pb. Já os alelos mutados, são visualizados no gel em tamanho normal do amplicon (460 pb), significando que não houve digestão enzimática nesta amostra. Como controle interno da técnica, utilizamos uma amostra JAK2 negativo (PAGLIARINI E SILVA *et al.*, 2013).

A técnica de digestão com a enzima Bsa XI foi realizada em apenas 19 das 26 amostras coletadas (dados não mostrados). A PCR-AE foi utilizada em maior escala por ser uma técnica específica para a detecção da mutação JAK2 V617F, rápida e de menor custo.

4.3.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO

Para a preparação do molde de sequenciamento, os *primers* da PCR-AE não foram marcados com nenhum corante fluorescente. Os produtos amplificados foram tratados com ExoSap (Biosciences®) para remover restos da reação. Em seguida, 1 uL de cada amostra foi novamente amplificada com os *primers* de sequenciamento (Applied Biosystems®).

As reações para sequenciamento foram purificadas usando o sistema *CleanSeq* (Bioscience®) e, em seguida, foram sequenciadas por eletroforese capilar ABI300.

As mutações foram investigadas por comparação com a sequência normal do gene *JAK2* (NM- 004972) e um controle interno normal foram incluídos em cada reação.

5 RESULTADOS

Todos os pacientes participantes do projeto atenderam a um critério maior e um critério menor, de acordo com os Critérios de Diagnóstico de PV organizados pela Organização Mundial de Saúde, 2008. Um critério de grande importância para o diagnóstico é a detecção da presença da mutação no gene *JAK2*. A utilização de sangue periférico possui sensibilidade e especificidade similar ao aspirado de medula óssea para a detecção da *JAK2 V617F* (TAKAHASHI *et al*, 2013).

O quadro 3 mostra algumas características clínico-hematológicas apresentadas por cada paciente no momento do diagnóstico de PV e o resultado para a presença da mutação *JAK2 V617F*. Destacamos a presença de três pacientes com idades inferiores (27, 48 e 45 anos) à faixa etária de prevalência da doença. Ao que tudo indica tais pacientes não apresentaram nenhuma alteração clínica em relação aos demais pacientes que foram diagnosticados mais tardiamente.

Dos 31 pacientes atendidos no Hospital Universitário/UFJF e Hospital ASCOMCER, apenas 26 pacientes aceitaram participar da pesquisa, tendo idade média de 48 anos, faixa etária entre 27 e 88 anos, sendo dez do sexo masculino e dezesseis do sexo feminino.

QUADRO 3: Dados clínico-hematológicos apresentados pelos pacientes.

PACIENTES	IDADE	SEXO	EVENTO TROMBÓTICO	HEMATÓCRITO %	HEMOGLOBINA g/dL	LEUCOMETRIA	PLAQUETAS	ESPLENOMEGALIA	JAK2 V617F
C.A.P	63	F	NÃO	68	20	11.600	481.000	NÃO	SIM
M.J.D.J	27	M	NÃO	58	18,1	10.100	720.000	SIM	SIM
R.A.B	77	M	NÃO	60	18,1	86.000	490.000	NÃO	SIM
R.M	68	M	NÃO	50	17,2	8.200	416.000	NÃO	SIM
M.P.A	82	F	NÃO	39	13	6.200	280.000	NÃO	SIM
T.G	66	F	NÃO	58	19	12.000	450.000	SIM	SIM
F.L.C.T	59	M	NÃO	55,9	19,4	16.200	356.000	SIM	SIM
J.C.A	41	M	NÃO	61	19,5	7.300	220.000	NÃO	SIM
J.S	48	M	NÃO	56	18,1	26.100	783.000	NÃO	SIM
M.C.L.S	71	F	NÃO	71,6	21,5	14.600	696.000	SIM	SIM
L.A.S	69	F	NÃO	59,1	19	12.000	541.000	NÃO	SIM
M.G.E	67	F	NÃO	68,4	22,1	12.800	841.000	NÃO	SIM
J.M.S	75	M	NÃO	37	11,7	5.200	360.000	NÃO	SIM
A.A.B	88	F	SIM	57	18,2	15.400	1.147.000	NÃO	SIM
F.B.F	55	M	SIM	58	19	6.500	480.000	SIM	SIM
E.S.N.S	63	F	SIM	47,2	15,2	7.200	253.000	SIM	SIM
T.S.M	74	F	NÃO	63,2	20,3	11.200	390.000	NÃO	SIM
R.M.A.A	62	F	SIM	57	18,7	16.500	473.000	SIM	SIM
M.D.L	78	F	SIM	54,7	17,6	6.900	744.000	NÃO	SIM
M.R.S.S	64	F	NÃO	57,9	18,6	10.100	651.000	SIM	SIM
A.R	72	M	NÃO	51,9	18,2	13.000	810.000	NÃO	SIM
I.T.S	54	F	NÃO	60	18,5	14.500	788.000	NÃO	SIM
M.H.G.A	57	F	NÃO	54	16,9	13.300	1.093.000	NÃO	SIM
A.S.E	58	M	SIM	62,3	21,3	10.000	496.000	NÃO	SIM
G.M.M.P	59	F	NÃO	55,1	18	9.300	366.000	SIM	NÃO
J.G.F.Y	57	F	NÃO	60	21	12.000	560.000	NÃO	NÃO

Fonte: A autora, 2014.

Inicialmente, utilizamos duas técnicas moleculares capazes de identificar a presença de mutações *JAK2* V617F. A digestão enzimática com *Bsa* XI foi realizada em 19 pacientes e posteriormente realizamos o diagnóstico utilizando a técnica de PCR-AE. Os resultados de ambas as técnicas foram avaliados e percebemos que, além da PCR-AE ser uma técnica fácil e de menor custo, os resultados são mais eficientes e seguros dos que os apresentados pela primeira técnica. Assim sendo, adotamos a técnica de PCR-AE como rotina.

Das 26 amostras coletadas, 24 (92,3%) foram positivas para a mutação p.V617F (Figura 8), apresentando dois fragmentos na altura de 364 e 203 pares de base (pb), indicando os alelos tipo selvagem e mutado, respectivamente.

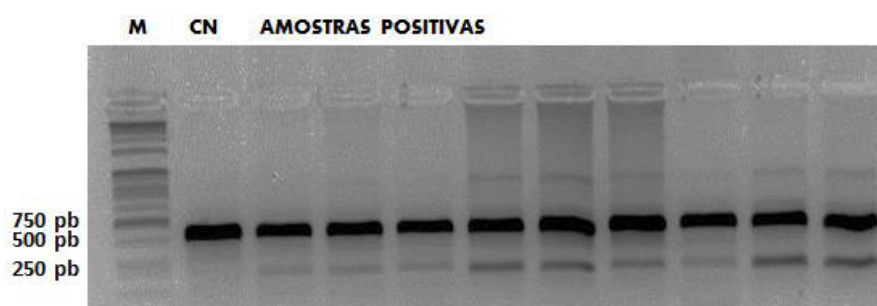


FIGURA 8: Gel de agarose 2%. Genotipagem para *JAK2* V617F de algumas das amostras positivas (Linhas 2- controle negativo, com apenas a banda de 364 pb e linhas 3 a 11- amostras positivas). Linha M (Marcador de peso molecular, 1 Kb DNA Ladder, Promega®).

Do total de amostras, duas (7,7%) foram negativas, aparecendo apenas uma banda na altura de 364 pb (Figura 9). A partir desse resultado, realizamos o sequenciamento automático para verificar a presença de outras mutações que poderiam estar presentes no éxon 12 do gene. O sequenciamento de ambas as amostras não revelou alteração na sequência de nucleotídeos para o éxon 12 do gene *JAK2* (dados não mostrados). Esses pacientes, diagnosticados como negativos para mutações no gene *JAK2*, não apresentaram sinais clínicos diferenciados em relação aos pacientes positivos para mutações no gene *JAK2* e também não apresentaram histórico de eventos trombóticos.

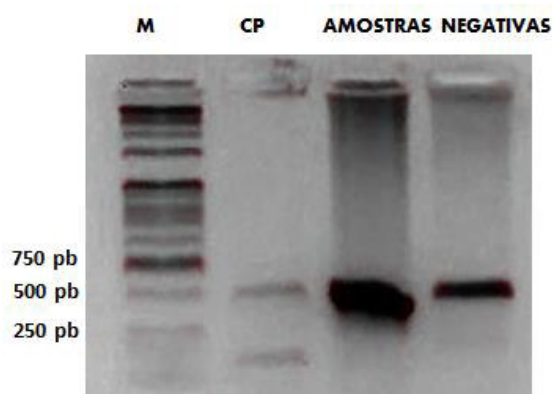


FIGURA 9: Gel de agarose 2%. Genotipagem para JAK2 V617F. (Linhas 2- controle positivo, apresentando as bandas de 203 pb e 364 pb e linhas 3 e 4- amostras negativas, com apenas a banda de 364 pb). Linha M (Marcador de peso molecular, 1 Kb DNA Ladder, Promega®).

Durante o estudo com os 26 pacientes encaminhados para o setor de aconselhamento genético, foi investigado a presença de PV familiar. Nenhum caso foi encontrado. No entanto, duas famílias nos chamaram a atenção devido à presença de algumas doenças hematológicas aparentemente segregando entre os familiares (Figuras 10 e 11), sendo descritas a seguir.

O paciente F.L.C.T (Registro PV10), sexo masculino, 59 anos, foi atendido no ambulatório do Hospital ASCOMCER/ Juiz de Fora, relatando plethora de mãos com sudorese, eritromelalgia e constatação de poliglobulia. O hemograma mostrava concentração de hemoglobina de 19,4 g/dL, hematócrito 56%, leucometria global de $16.200/\text{mm}^3$ e plaquetas a $350.600/\text{mm}^3$. Esses índices estavam acima dos valores de referência para a normalidade. Apresentava esplenomegalia a 14,6 cm do rebordo costal esquerdo e biópsia de medula óssea com hiperplasia das três séries medulares, principalmente eritroides e megacariócitos sugerindo Policitemia Vera. O paciente foi encaminhado ao serviço de aconselhamento genético da Universidade Federal de Juiz de Fora para avaliação molecular quanto à presença de mutações no gene *JAK2*.

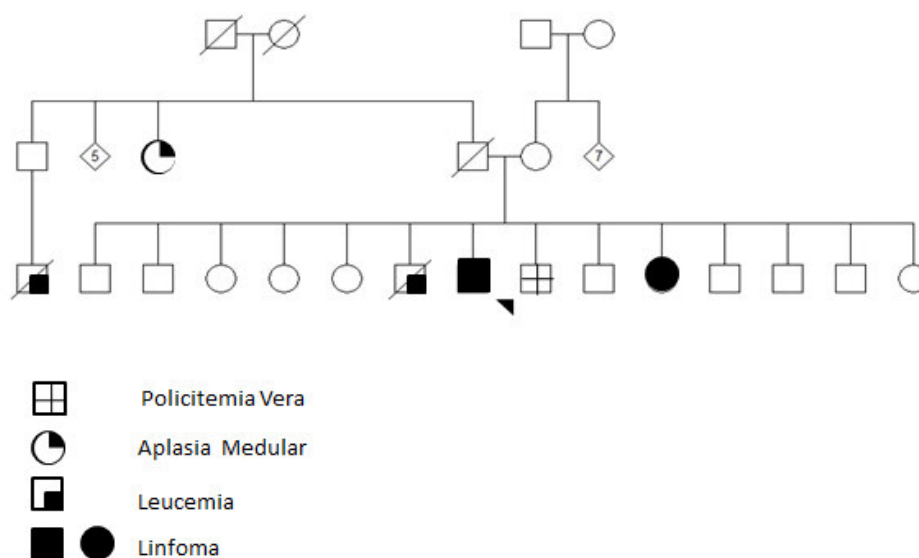


FIGURA 10: Heredograma da família do paciente F.L.C.T.

O outro caso foi de T.G (Registro PV08), 66 anos, atendida no mesmo ambulatório, que procurou os serviços hematológicos sete meses após ter realizado uma histerectomia e apresentar um quadro clínico de hipercoagulabilidade. Ao fazer um hemograma apresentou índices elevados para hemoglobina (19 g/dL), hematócrito (58%), leucometria global (12.000/mm³) e plaquetas (571.200/mm³), além de esplenomegalia a 16 cm e biópsia de medula óssea compatível para doença mieloproliferativa.

Segundo relatos da paciente, haveria um caso de leucemia na família. Realizamos um aconselhamento genético para verificar a ocorrência de outras doenças hematológicas (Figura 11). No entanto, esse caso nos chamou a atenção para o quadro de hipercoagulabilidade apresentado pela paciente, destacando a presença de históricos de trombose e possíveis recorrências em muitos casos de NMPs.

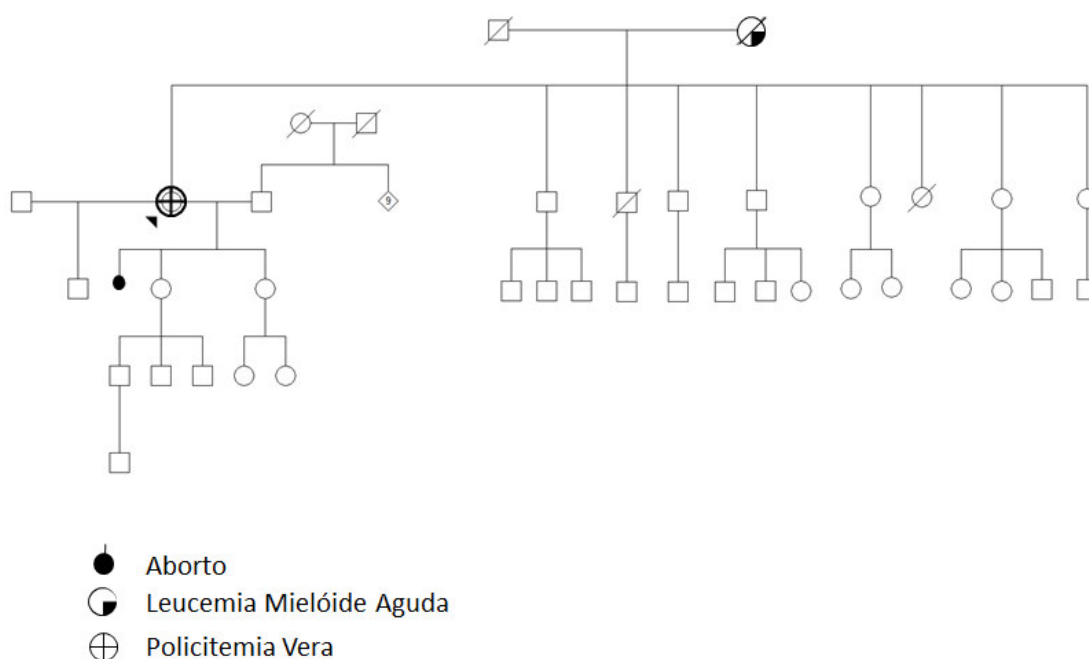


FIGURA 11: Heredograma da família da paciente T.G.

Além da presença da mutação p.V617F, foi constatada a presença de eventos trombóticos em 25% (6/24) dos pacientes JAK2 positivos. A tabela 2 mostra a relação dos dados clínicos de cada paciente em relação ao número de eventos trombóticos e as mutações no gene *JAK2*.

TABELA 2: Relação de dados clínicos observados em relação a eventos trombóticos e as mutações em *JAK2*.

Todos os pacientes			Média Hmt	Média Hg	Nº Pacientes com	Nº Pacientes com
	Nº	%	%	%	Plaquetas > 450 000 mm ³	Leucócitos > 10 000 mm ³
Homens	10	37,03	55,01	18,06	6/10	5/10
Mulheres	16	62,96	54,83	18,13	12/16	11/16
Pacientes com Histórico de Trombose			Média Hmt	Média Hg	Nº Pacientes com	Nº Pacientes com
	Nº	%	%	%	Plaquetas > 450 000 mm ³	Leucócitos > 10 000 mm ³
Trombose	6	25	56,98	18,12	5/6	3/6
Pacientes com Mutação JAK2V617F						
	Nº	%				
Positivo	24	92,3				
Negativo	2	7,7				
Tratamentos utilizados			(n=26)			
	Nº					
Hidroxiuréia	26					
Anticoagulantes	7*					
Sangrias	15					
Esplenomegalia	9					

* Dos 7 pacientes tratados com anticoagulantes, dois apresentaram histórico de trombose

Fonte: A autora, 2014.

6 DISCUSSÃO

A investigação de mutações no gene *JAK2* em pacientes clinicamente diagnosticados com PV é de extrema importância para o diagnóstico molecular desses pacientes.

A positividade para a mutação *JAK2* V617F foi de 92,3%, sendo que dois dos 26 pacientes (7,7%) foram negativos para mutações no gene *JAK2*. A porcentagem de detecção da mutação está de acordo com dados apresentados na literatura científica que é de aproximadamente 95-98% para os casos p.V617F positivos (GÄBER *et al.*, 2013). A análise de outras possíveis mutações no gene *JAK2* foi investigada, não sendo detectada qualquer alteração. No entanto, não podemos descartar o diagnóstico clínico de PV, que deve ser feito com cautela, pois é necessário levar em consideração demais genes que podem estar envolvidos na manifestação da doença (TEFFERI, 2010; FREITAS, SANTOS e MARANDUBA, 2013), embora a OMS faça citação apenas ao *JAK2*, e que outras doenças NMPs devem ser consideradas (SILVER *et al.*, 2013). A ausência de mutações *JAK2* V617F e no gene *JAK2* de modo geral, são frequentemente baixas (GÄBER *et al.*, 2013). No entanto, neste estudo, obtivemos uma frequência maior para a ausência dessas mutações do que é relatado na literatura científica.

Inicialmente, a técnica de digestão enzimática por *Bsa* XI foi empregada somente nas primeiras amostras de sangue periférico, pois esta técnica é considerada menos sensível ao diagnóstico de PV por apresentar alguns resultados falso-negativos. A digestão incompleta de amplicons podem potencialmente gerar resultados desse tipo, fragilizando o método de detecção (FRANTZ *et al.*, 2007). Nos indivíduos comprometidos pela doença, a mutação p.V617F anula o sítio de ação da enzima, fazendo com que sejam observados apenas um fragmento na eletroforese.

Sendo assim, realizamos posteriormente apenas a PCR-AE. Esta técnica foi desenvolvida por Baxter *et al.* (2005) como uma ferramenta molecular para a detecção de mutações *JAK2* V617F em pacientes com NMPs BCR-ABL negativas, onde os alelos tipo mutados são amplificados com *primers* específicos que possuem um *mismatch* na porção 3' do iniciador permitindo a amplificação apenas do alelo mutante. Há ainda outro iniciador, para controle interno da reação, que permite a amplificação de ambos os alelos. O *primer reverse* é comum aos *primers forward*

(BAXTER *et al.*, 2005; TAN, WESTERMAN e DOBROVIC, 2007; PAGLIARINI e SILVA, 2013).

Com os dados aqui apresentados e os demais estudos citados, observamos que a frequência de casos de pacientes com PV em um único centro de atendimento na cidade de Juiz de Fora se encontram na faixa de prevalência da literatura para o éxon 14 (~ 95%) (HA *et al.*, 2012; KILADJIAN, 2012). Além da presença da mutação p.V617F foi constatada a presença de eventos trombóticos em 25% (6/24) dos pacientes *JAK2* positivos.

Entre as principais complicações da PV estão os eventos tromboembólicos, sendo causa de morbi-mortalidade nesses pacientes. Além das características clínico-laboratoriais, tais como, idade, histórico prévio de eventos trombóticos, obesidade, hipertensão, hiperlipidemia, aumento na contagem de células sanguíneas e alterações na composição dessas células, fazem com que ocorra uma mudança para o fenótipo pró-trombótico, facilitando os eventos trombóticos (VIANELLO *et al.*, 2011).

As mudanças no estado pró-trombótico englobam tanto a expressão de fatores pró-coagulantes (micropartículas plaquetárias) e a ativação de propriedades proteolíticas, a secreção de citocinas e a expressão de moléculas de adesão. Há também uma resistência à proteína de ativação C, responsável por inativar alguns fatores de coagulação já ativados. Tais características pró-trombóticas irão modificar o endotélio vascular em resposta ao processo inflamatório das citocinas, a hiperviscosidade e a presença de proteases derivadas de leucócitos, tais como, a elastase, a catepsina G e a mieloperoxidase.

Dessa forma, um aumento nas moléculas de adesão do endotélio favorece o acúmulo de agregados de plaquetas, eritrócitos e leucócitos na parede vascular ajudando na deposição de fibrina e contribuindo para a ativação da cascata de coagulação (BARBUI, FINAZZI e FALANGA, 2013).

Mesmo na ausência de manifestações trombóticas, os pacientes com NMPs apresentam um estado de hipercoagulabilidade que pode ser identificado por um aumento na concentração de vários marcadores plasmáticos do sistema de ativação hemostático (VIANELLO *et al.*, 2011). No mais, estudos sugerem que esses pacientes com NMPs que possuem a mutação *JAK2* V617F tem um risco maior para tais complicações trombóticas, possivelmente devido ao aumento plaquetário e

ativação dos leucócitos (XAVIER *et al.*, 2008).

O risco trombótico em pacientes com PV é mais proeminente em pacientes com idade próxima aos 60 anos e naqueles com histórico de trombose, podendo ser incluídos na categoria de alto risco. Porém, os riscos recorrentes nessa categoria não são homogêneos, não representando uma tendência previsível (STEFANO *et al.*, 2007; SEKHAR *et al.*, 2013).

Com todo o exposto, é pertinente ressaltar que o estado trombofílico adquirido em PV é multifacetado e complexo, não sendo possível reduzir a explicação de ocorrências de trombozes a apenas uma via, já que vários fatores contribuem para a ocorrência da mesma.

Trabalhos apontam a prevalência de pacientes com PV em associação com a ocorrência de eventos trombóticos. Rugerri *et al.* (2003) estudaram uma população de uma cidade no norte da Itália, onde a prevalência de PV é de 30 casos/100.000 habitantes. Destes, 10-20% (seis pacientes) podem ter complicações trombóticas. Marchioli *et al.* (2005) realizaram um estudo em 12 países europeus, sendo que dos 1.638 pacientes com PV, 38,6% (633 pacientes) tiveram histórico de trombose.

Com isso, salientamos a importância da investigação das causas de eventos trombóticos que acometem os pacientes, principalmente as de origem venosa com origem incomum, ressaltando para a investigação de doenças NMPs, uma vez que há alta ocorrência de casos trombóticos registrados em pacientes com essas neoplasias, além do risco de recorrência se não forem utilizados anticoagulantes ou antiplaquetários no tratamento desses pacientes, principalmente naqueles com idade próxima aos 60 anos. O objetivo da terapia é reduzir os riscos de trombose e hemorragias. Em particular, baixas doses de ácido acetilsalicílico (81-100 mg/dia) ou em combinação com flebotomias e/ou hidroxiuréia representam um componente consistente para o tratamento, independente da estratificação de risco (PATRONO *et al.*, 2013).

O tratamento da PV em pacientes p.V617F positivos ainda não é diretamente associado ao uso de inibidores da via JAK-STAT. No entanto, as células que expressam JAK2 V617F parecem ser mais sensíveis aos inibidores JAK2 do que as células que não possuem essa mutação (FRIEDMAN *et al.*, 2007).

7 CONCLUSÕES

Os Hospitais HU/UFJF e ASCOMCER de Juiz de Fora, Minas Gerais, recebem vários pacientes, da cidade e região, encaminhados para o diagnóstico e tratamento de várias doenças, entre elas as neoplasias mieloproliferativas. A frequência encontrada neste estudo para a PV (92,3%) é coerente com dados apresentados na literatura (cerca de 95%). Ainda, chamamos a atenção para a correlação genótipo-fenótipo na porcentagem de eventos trombóticos de origem venosa ocorridos nos pacientes (25%) e salientamos a importância de se investigar esses eventos em associação a alguma NMP.

A importância da investigação da mutação JAK2 V617F na prática do diagnóstico de PV e a relevância do diagnóstico para a presença da mutação, nos casos JAK2 V617F negativos, ainda precisam ser melhor investigados, principalmente em relação às demais vias de sinalização envolvida com a ativação da via JAK-STAT.

REFERÊNCIAS

- AXELRAD, A.A.; ESKINAZI, D.; CORREA, P.N.; AMATO, D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. **Blood**, v. **96**, p. 3310-3321, 2000.
- BARBUI, T.; FINAZZI, G.; FALANGA, A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. **Blood**, v. **122**, p. 2176- 2184, 2013.
- BENCH, A. J.; ERBER, W. N.; SCOTT, M. A. Molecular genetic analysis of haematological malignancies: Acute leukaemias and myeloproliferative disorders. **Clinical & Laboratory Haematology**, v. **27**, p. 148-171, 2005.
- CAZZOLA, M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. **The Hematology Journal**, v. **92**, p. 1585-1589, 2007.
- CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. **32**, p. 308-316, 2010.
- COKIC, V. P.; BHATTACHARYA, B.; BELESLIN-COKIE, B. B.; NOGUCHI, C-T.; PURI, R . K.; SCHECHTER, A .N. JAK-STAT and AKT pathway-coupled genes in erythroid progenitor cells through ontogeny. **Journal of Translational Medicine**, v. **10**, p. 1-11, 2012.
- CONSTANTINESCU, S.N.; GIRARDOT, M.; PECQUET, C. Mining for JAK-STAT mutations in cancer. **Cell Press**, v. **33**, p. 122-131, 2007.
- DAMESHEK, W. Editorial: Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes. **Blood**, v. **6**, p. 372–375, 1951.
- DEN DUNNEN, J. T.; ANTONARAKIS, S. E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Human mutation**, v. **15**, n. 1, p. 7–12, 2000.
- DUSA, A.; STAERK, J.; ELLIOTT, J.; PECQUET, C.; POIREL, H.A.; JOHNSTON, J.A.; CONSTANTINESCU, S.N. Substitution of Pseudokinase Domain Residue Val-617 by Large Non-polar Amino Acids Causes Activation of JAK2. **The Journal of biological chemistry**, v. **283**, p. 12941-8, 2008.
- E JOANNA BAXTER, SCOTT, L. M.; CAMPBELL, P. J.; EAST, C. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **The Lancet**, v. **365**, p. 1054–1061, 2005.
- FINAZZI, G.; BARBUI, T. How I treat patients with polycythemia vera. **Blood**, v. **109**, n. 12, p. 5104–11, 2007.

FISKUS, W.; GANGULY, S.; KAMBHAMPATI, S.; BHALLA, K. N. Role of additional novel therapies in myeloproliferative neoplasms. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 26, n. 5, p. 959–80, 2012.

FRANTZ, C.; SEKORA, D. M.; HENLEY, D. C.; HUANG, C-K.; PAN, Q.; QUIGLEY, N. B.; GORMAN, E.; HUBBARD, R. A.; MIRZA, I. Comparative Evaluation of Three JAK2V617F Mutation Detection Methods. **American Journal Clin Pathol.**, v. 128, p. 865- 874, 2007.

FRIEDMAN J.; NUSSENZVEIG, R.; LIU, P.; RODGERS, J.; BURN, T.; HALEY, P.; SCHERLE, P.; NEWTON, R.; HOLLIS, G.; FRIEDMAN, S. Discovery and preclinical characterization of INCB 018424, a selective JAK2 inhibitor for the treatment of myeloproliferative disorders. **American Society of Hematology**, v. 110, p. 35-38, 2007.

GÄBER K.; BEHRMANN, I.; HAAN, C. JAK2 mutants (e.g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms. **Landes Bioscience**, v. 2, p. e25025-1-17, 2013.

GARI, M. The Role of Janus Kinase 2 (JAK2) in the Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders. **Journal of King Abdulaziz University-Medical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 3–19, 2009.

GERON, I.; ABRAHAMSSON, A.E.; BARROGA, C.F.; KAVALERCHIK, E.; GOTLIB, J.; HOOD, J.D.; DUROCHER, J.; MAK, C.C.; NORONHA, G.; SOLL, R.M.; TEFFERI, A.; KAUSHANSKY, K. Selective Inhibition of JAK2-Driven Erythroid Differentiation of Polycythemia Vera Progenitors. **Cancer Cell**, v. 13, p. 321-30, 2008.

GODFREY, A. L.; GREEN, A. R. Genotype-phenotype interactions in the myeloproliferative neoplasms. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 26, n. 5, p. 993–1015, 2012.

GOLDMAN, J. M. A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 17, p. 1744–6, 2005.

HA, J-S.; KIM, Y-K.; JUNG, S-L.; JUNG, H-R.; CHUNG, I-S. Correlations between Janus kinase 2 V617F Allele Burdens and Clinicohematologic Parameters in Myeloproliferative Neoplasms. **Annals of laboratory medicine**, v. 32, p. 385-91, 2012.

HAFERLACH, T.; BACHER, U.; KERN, W.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, C. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. **Annals of hematology**, v. 87, n. 1, p. 1–10, 2008.

HARICHARAN, S.; LI, Y. STAT signaling in mammary gland differentiation, cell survival and tumorigenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, p. 560-569, 2013.

HOOKHAM, M. B.; ELLIOTT, J.; SUESSMUTH, Y.; STAERK, J.; WARD, A. C.; VAINCHENKER, W.; PERCY, M. J.; McMULLIN, M. F.; CONSTANTINESCU, S. N.; JOHNSTON, J. A. The myeloproliferative disorder- associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. **Blood**, v. **109**, p. 4924-4929, 2007.

HUANG, L.J-S.; CONSTANTINESCU, S.N.; LODISH, H.F. The N-Terminal Domain of Janus kinase 2 Is required for Golgi Processing and Cell Surface Expression of erythropoietin Receptor. **Molecular Cell**, v. **8**, p. 1327-38, 2001.

IKEDA, K.; OGAWA, K.; TAKEISHI, Y. The Role of HMGA2 in the Proliferation and Expansion of a Hematopoietic Cell in Myeloproliferative Neoplasms. **Journal Med. Science**, v. **58**, p. 91-100, 2012.

JAMES, C. The JAK2V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? **Hematology/ American Society of Hematology**, p. 69–75, 2008.

JIANG, Q.; SONG, C.; NANGREAVE, J.; LIU, X.; LIN, L.; QIU, D.; WANG, Z-G.; ZOU, G.; LIANG, X.; YAN, H.; DING, B. DNA Origami as a Carrier for Circumvention of Drug Resistance. **Journal of the American Chemical Society**, v. **134**, p. 13396-13403, 2012.

JONES, A. V.; CHASE, A.; SILVER, R. T. OSCIER, D.; ZOI, K.; WANG, Y.L.; CARIO, H.; PAHL, H.L.; COLLINS, A.; REITER, A.; GRAND, F.; CROSS, N.C.P. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. **Nature genetics**, v. **41**, n. 4, p. 446–9, 2009.

FREITAS, R.M; SANTOS, M.O.; MARANDUBA, C.M.C. The JAK2 gene as a protagonist in chronic myeloproliferative neoplasms. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.**35**, p. 278- 279, 2013.

KAUSHANSKY, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. **The Journal of Clinical investigation**, v. **115**, p. 3339-3347, 2005.

KAUSHANSKY, K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of JAK2: Dameshek's 54 year old speculation comes of age. **National Institutes Of Health**, v. **20**, n. 1, p. 5–12, 2007.

KILADJIAN, J. J. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. **Hematology American Society of Hematology**, v. **2012**, p. 561–6, 2012.

KILPIVAARA, O.; LEVINE, R L. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K**, v. **22**, n. 10, p. 1813–7, 2008.

KIM, H-R.; CHOI, H-J.; KIM, Y-K.; KIM, H-J.; SHIN, J-H.; SUH, S-P.; RYAING, D-W.; SHIN, M-G. Allelic Expression Imbalance of JAK2 V617F Mutation in BCR-ABL Negative Myeloproliferative Neoplasms. **PloS one**, v. **8**, n. 1, p. e52518, 2013.

KIM, J.; HADDAD, R. Y.; ATALLAH, E. Myeloproliferative neoplasms. **Disease-a-month : DM**, v. 58, n. 4, p. 177–94, 2012.

KJAER, L.; WESTMAN, M.; RILEY, C. H.; HOGDALL, E.; BJERRUM, O. W.; HASSELBALCH, H. A highly sensitive quantitative real-time PCR assay for determination of mutant JAK2 exon 12 allele burden. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33100, 2012.

KHWAJA, A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. **British Journal of Haematology**, v. 134, p. 366-384, 2006.

KOOPMANS, S. M.; BOT, F. J.; SCHOUTEN, H. C.; JANSSEN, J.; MARION, A. MW. The involvement of Galectins in the modulation of the JAK/STAT pathway in myeloproliferative neoplasia. **Am Journal Blood Res**, v. 2, p. 119-127, 2012.

KOTA, J.; CACERES, N.; CONSTANTINESCU, SN. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 22, p. 1828-1840, 2008.

KRALOVICS, R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 22, n. 10, p. 1841–8, 2008.

LAKEY, M. A; PARDANANI, A.; HOYER, J. D.; NGUYEN, P.L.; LASHO, T.L.; TEFFERI, A.; HANSON, C.A. Bone marrow morphologic features in polycythemia vera with JAK2 exon 12 mutations. **American journal of clinical pathology**, v. 133, n. 6, p. 942–8, 2010.

LANDGREN, O.; GOLDIN, L. R.; KRISTINSSON, S. Y.; HELGADOTTIR, E.A.; SAMUELSSON, J.; BJORKHOLM, M. Plenary paper Increased risks of polycythemia vera , essential thrombocythemia , and myelofibrosis among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2199–2204, 2008.

LAUGHLIN, T.S.; MOLITERNO, A.R.; STEIN, B.L.; ROTHBERG, P.G. Detection of Exon 12 Mutations in the *JAK2* Gene enhanced Analytical Sensitivity using Clamped PCR and Nucleotide Sequencing. **The Journal of Molecular diagnostics**, v. 12, p. 278-82, 2010.

LU, X.; LEVINE, R.; TONG, W.; WERNING, G.; PIKMAN, Y.; ZARNEGAR, S.; GILLILAND, D.G.; LODISH, H. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. **PNAS**, v. 102, p. 18962-7, 2005.

MARCHIOLI, R.; FINAZZI, G.; LANDOLFI, R.; KUTTI, J.; GISSLINGER, H.; PATRONO, C.; MARILUS, R.; VILLEGAS, A.; TOGNONI, G.; BARBUI, T. Vascular and Neoplastic Risk in a Large Cohort of Patientes with Polycythemia Vera. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, p. 2224- 2232 , 2005.

MASCARENHAS, J.; ROPER, N.; CHAURASIA, P.; HOFFMAN, R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. **Clin Epigenet**, v. 2, p. 197-212, 2011.

McLORNAN, D.; PERCY, M.; MCMULLIN, M. F. JAK2 V617F: A Single Mutation in the Myeloproliferative Group of Disorders. **The Ulster Medical Society**, v. 75, n. 2, p. 112–119, 2006.

MODAN, B. Polycythemia a review of epidemiological and clinical aspects. **Journal of Chronic Diseases**, v. 18, p. 605–645, 1965.

MORGAN, K. J.; GILLILAND, D. G. A Role for JAK2 Mutations in Myeloproliferative Diseases. **Annu. Rev. Med.**, v. 59, p. 213-22, 2007.

NARAMURA, M.; NADEAU, S.; MOHAPATRA, B.; AHMAD, G.; MUKHOPADHYAY, C.; SATTLE, M.; RAJA, S. M.; NATARAJAN, A.; BAND, V.; BAND, H. Mutant Cbl proteins as oncogenic drivers in myeloproliferative disorders. **Oncotarget**, v. 2, p. 245- 250, 2011.

OLCAYDU, D.; RUMI, E.; HARUTYUNYAN, A.; PASSAMONTI, F.; PIETRA, D.; PASCUTTO, C.; BERG, T.; JÄGER, R.; HAMMOND, E.; CAZZOLA, M.; KRALOVICS, R. The role of the JAK2 GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. **Haematologica**, v. 96, n. 3, p. 367–74, 2011.

PAGLIARINI E SILVA, S.; SANTOS, B.C.; PEREIRA, E.M. F.; FERREIRA, M.E.; BARALDI, E.C.; SELL, A.M.; VISENTAINER, J.E.L. Evaluation of the association between the JAK2 46/1 haplotype and chronic myeloproliferative neoplasms in a Brazilian population. **Clinics science**, v. 68, n. 1, p. 5–9, 2013.

PASSAMONTI, F.; RUMI, E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. **Haematologica**, v. 94, n. 1, p. 7–10, 2009.

PASSAMONTI, F.; THIELE, J.; GIRODON, F.; RUMI, E.; CAROBBIO, A.; GISSLINGER, H.; KVASNICKA, H.M.; RUGGERI, M.; RANDI, M.L.; GANGAT, N.; VANNUCCHI, A.M.; GIANATTI, A.; GISSLINGER, B.; MÜLLAUER, L.; RODEGHIRO, F.; d'AMORE, E.S.G.; BERTOZZI, I.; HANSON, C.A.; BOVERI, E.; MARINO, F.; MAFFIOLI, M.; CARAMAZZA, D.; ANTONIOLI, E.; CARRAI, V.; BUXHOFER-AUSCH, V.; PASCUTTO, C.; CAZZOLA, M.; BARBUI, T.; TEFFERI, A. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1197–201, 2012.

PATRONO, C.; ROCCA, B.; De STEFANO, V. Platelet activation and inhibition in polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Blood**, v.121, p. 1701- 1711, 2013.

PERROTTA, S.; CUCCIOLLA, V.; FERRARO, M.; RONZONI, L.; TRAMONTANO, A.; ROSSI, F.; SCUDIERI, A. C.; BORRIELLO, A.; ROBERTI, D.; NOBILI, B.; CAPPELLINI, M. D.; OLIVA, A.; AMENDOLA, G.; MIGLIACCIO, A. R.; MANCUSO, P.; MARTIN-PADURA, I.; BERTOLINI, F.; YOON, D.; PRCHAL, J. T.; RAGIONE, F.

D. EPO receptor Gain-of-Function Causes Hereditary Polycythemia, Alters CD34⁺ Cell Differentiation and Increases Circulating Endothelial Precursors. **Plos one**, v. 5, p. e12015, 2010.

PLO I.; NAKATAKE, M.; MALIVERT, L.; VILLARTAY, J-P.; GIRAUDIER, S.; VILLEVAL, J-L.; WIESMULLER, L.; VAINCHENKER, W. JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 112, p. 1402-1412, 2008.

QUINTÁS-CARDAMA, A. The role of Janus kinase 2 (JAK2) in myeloproliferative neoplasms: therapeutic implications. **Leukemia research**, v. 37, n. 4, p. 465–72, 2013.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 1281-1282, 2004.

RICE, KL.; LIN, X.; WOLNIAK, K.; EBERT, BL.; BERKOFKY-FESSLER, W.; BUZZAI, M.; SUN, Y.; XI, C.; ELKIN, P.; LEVINE, R.; GOLUB, T.; GILLILAND, DG.; CRISPINO, JD.; LICHT, JD.; ZHANG, W. Analysis of genomic aberrations and gene expression profiling identifies novel lesions and pathways in myeloproliferative neoplasms. **Blood Cancer Journal**, v. 1, p. e40, 2011.

RÖDER, S.; STEIMLE, C.; MEINHARDT, G.; PAHL, H. L. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. **Experimental hematology**, v. 29, p. 694–702, 2001.

RUGGERI, M.; TOSETTO, A.; FREZZATO, M.; RODEGHIRO, F. The Rate of Progression to Polycythemia Vera or Essential Thrombocythemia in Patients with Erythrocytosis or Thrombocytosis. **Ann International Med.**, v. 139, p. 470- 475, 2003.

SAHARINEN, P.; VIHINEN, M.; SILVENNOINEN, O. Autoinhibition of Jak2 Tyrosine Kinase Is Dependent on Specific Regions in Its Pseudokinase Domain. **Molecular biology of the Cell**, v. 14, n. April, p. 1448–1459, 2003.

SCHAFER, A. I. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4214–22, 2006.

SCOTT, L. M.; TONG, W.; LEVINE, R. L.; SCOTT, M. A.; BEER, P. A.; STRATTON, M. R.; FUTREAL, A.; ERBER, W. N.; McMULLIN, M. F.; HARRISON, C. N.; WARREN, A. J.; GILLILAND, D.G.; GREEN, A. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 459-468, 2007.

SCOTT, L. M.; REBEL, V. I. JAK2 and genomic instability in the myeloproliferative neoplasms: A case of the chicken or the egg?. **American Journal of Hematology**, v. 87, p. 1028-36, 2012.

SEKHAR, M.; McVINNIE, K.; BURROUGHS, A. K. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms. **British Journal of Haematology**, v. **162**, p. 730-747, 2013.

SHIH, A. H.; ABDEL-WAHAB, O.; PATEL, J. P.; LEVINE, R.L. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. **Nature**, v. **12**, n. 9, p. 599–612, 2012.

SILVER, R. T.; CHOW, W.; ORAZI, A.; ARLES, S. P.; GOLDSMITH, S. J. Evaluation of WHO criteria for diagnosis of polycythemia vera: a prospective analysis. **Blood**, v. **122**, p. 1881- 1886, 2013.

SMITH, C. A.; FAN, G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. **Human pathology**, v. **39**, n. 6, p. 795–810, 2008.

SPIVAK, J. L.; BAROSI, G.; TOGNONI, G.; BARBUI, T.; FINAZZI, G.; MARCHIOLI, R.; MARCHETTI, M. Chronic Myeloproliferative Disorders. **American society of hematology**, v. **2003**, n. 1, p. 200–224, 2003.

STEELMAN, L. S.; ABRAMS, S. L.; WHELAN, J.; BERTRAND, F. E.; LUDWIG, D. E.; BÄSECKE, J.; LIBRA, M.; STIVALA, F.; MILELLA, M.; TAFURI, A.; LUNGHI, P.; BONATI, A.; MARTELLI, A. M.; McCUBREY, J. A. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and JAK/STAT pathways to leukemia. **Leukemia**, v. **22**, p. 686-707, 2008.

STEFANO, V.; ZA, T.; ROSSI, E.; VANNUCCHI, A. M.; RUGGERI, M.; ELLI, E.; MICÒ, C.; TIEGHI, A.; CACCIOLA, R. R.; SANTORO, C.; GERLI, G.; VIANELLI, N.; GUGLIELMELLI, P.; PIERI, L.; SCOGNAMIGLIO, F.; RODEGHIERO, F.; POGLIANI, E. M.; FINAZZI, G.; GUGLIOTTA, L.; MARCHIOLI, R.; LEONE, G.; BARBUI, T. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. **Haematologica**, v. **93**, p. 372- 380 , 2008.

TAKAHASHI, K.; PATEL, K. P.; KANTARJIAN, H.; LUTHRA, R.; PIERCE, S.; CORTES, J.; VERSTOVSEK, S. JAK2 p.V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. **122**, p. 3784- 3786, 2013.

TAMIYA, T.; KASHIWAGI, I.; TAKAHASHI, R.; YASUKAWA, H.; YOSHIMURA, A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. **31**, n. 5, p. 980–5, 2011.

TAN, A. Y. C.; WESTERMAN, D. A.; DOBROVIC, A. A simple, rapid, and sensitive method for the detection of the JAK2 V617F mutation. **American journal of clinical pathology**, v. **127**, n. 6, p. 977–81, 2007.

TEFFERI, A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. **Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 22, n. 1, p. 3–13, 2008.

TEFFERI, A.; THIELE, JUERGEN; VARDIMAN, J.W. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. **Cancer**, v. 115, n. 17, p. 3842–7, 2009.

TEFFERI, A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. **American journal of hematology**, v. 87, n. 3, p. 285–93, 2012.

TEOFILI, L.; MARTINI, M.; CENCI, T.; GUIDI, F.; TORTI, L.; GIONA, F.; FOÀ, R.; LEONE, G.; LAROCCA, L. M. Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. **International Journal Cancer**, v. 123, p. 1586- 1592, 2008.

UNGUREANU, D.; WU, J.; PEKKALA, T.; NIRANJAN, Y.; YOUNG, C.; JENSEN, O.N.; XU, C-F.; NEUBERT, T.A.; SKODA, R.C.; HUBBARD, S.R.; SILVENNOINEN, O. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 9, p. 971–6, 2011.

VAINCHENKER, W.; DELHOMMEAU, F.; CONSTANTINESCU, S. N.; BERNARD, O. A.; DC, W. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms Review article New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, p. 1723–1735, 2011.

VANNUCCHI, A.M.; ANTONIOLI, E.; GUGLIELMELLI, P.; RAMBALDI, A.; BAROSI, G.; MARCHIOLI, R.; MARFISI, R.M.; FINAZZI, G.; GUERINI, V.; FABRIS, F.; RANDI, M.L.; De STEFANO, V.; CABERLON, S.; TAFURI, A.; RUGGERI, M.; SPECCHIA, G.; LISO, V.; ROSSI, E.; POGLIANI, E.; GUGLIOTTA, L.; BOSI, A.; BARBUI, T. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 840–6, 2007.

VARDIMAN, J.W.; THIELE, J.; ARBER, D.A.; BRUNNING, R.D.; BOROWITZ, M.J.; PORWIT, A.; HARRIS, N.L.; LeBEAU, M.M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; TEFFERI, A.; BLOOMFIELD, C.D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia : rationale and important changes The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute le. **Blood**, v. 114, p. 937–951, 2009.

VIANELLO, F.; BATTISTI, A.; CELLA, G.; MARCHETTI, M.; FALANGA, A. Defining the thrombotic Risk in Patients with Myeloproliferative Neoplasms. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 1131- 1137, 2011.

XAVIER, S. G.; GADELHA, T.; SCHAFFEL, R.; BRITTO, L.; PIMENTA, G.; RIBEIRO, D. D.; SABINO, A. P.; PIRES, V.; RENAULT, I. Z.; SPECTOR, N. Low prevalence of

the JAK2V617F in patients with ischemic stroke or cerebral venous thrombosis. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 19, p. 468-469, 2008.

WALZ, C.; CROSS, N.; ETTEN, R.V.; REITER, A. Comparison of mutated ABL1 and JAK2 as oncogenes and drug targets in myeloproliferative disorders. **Leukemia**, v. 22, n. 7, p. 1320–1334, 2008.

WILLIAMS, D.M.; KIM, A.H.; ROGERS, O.; SPIVAK, J.L.; MOLITERNO, A.R. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. **Experimental Hematology**, v. 35, p. 1641-6, 2007.

YAMAOKA, K.; SAHARINEN, P.; PESU, M.; HOLT III, V.ET.; SILVENNOINEN, O.; O'SHEA, J.J. The Janus kinases (Jaks). **Genome biology**, v. 5, n. 12, p. 253–253.6, 2004.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 6, p. 454–65, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1— Parecer consubstanciado do CEP



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA-MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação molecular de pacientes do Sistema Único de Saúde com Policitemia Vera, Mielofibrose Idiopática Crônica e Trombocitemia.

Pesquisador: Carlos Magno da Costa Maranduba

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

CAAE: 09109612.1.0000.5133

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora- MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 207.573

Data da Relatoria: 28/01/2013

Recomendações:

Nenhuma recomendação.

Projeto aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ProjetoAprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

JUIZ DE FORA, 27 de Fevereiro de 2013

**Assinador por:
Gisele Aparecida Fófano
(Coordenador)**

E-mail: pesquisa@huffj.ufff.br
Endereço: Rua Catulo Breviglieri, s/n- Comitê de Ética
Bairro: Santa Catarina CEP: 36.036-110
UF: MG Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32) 4009--5187
Fax: (32) 4009-5160

ANEXO 2— TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: “Estudo Molecular de pacientes do Sistema Único de Saúde com Policitemia Vera, Mielofibrose idiopática Crônica e Trombocitemia”.

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima referido. Este estudo científico é importante para obtenção de amostras de material genético (Ácido Desoxirribonucléico –DNA; e Ácido Ribonucléico –RNA), visando contribuir para o diagnóstico molecular de doenças genéticas humanas no Laboratório de Genética e Biotecnologia do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), os quais poderão ser usadas em estudos de doenças hematológicas. Esclarecemos também que a obtenção dessas amostras de sangue pelo nosso grupo de pesquisa não trarão riscos aos pacientes. Sua colaboração neste estudo será de grande importância.

Nome: Data de Nascimento ___/___/___ Endereço:.....nº.....Complemento.....Cidade:.....UF.....CEP.....Tel (.....).....

Eu , RG:....., abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade ser voluntário(a) do estudo “**Estudo Molecular de pacientes do Sistema Único de Saúde com Policitemia Vera, Mielofibrose idiopática Crônica e Trombocitemia**”, visando contribuir com a pesquisa para diagnóstico das doenças acima mencionadas. Declaro que obtive todas as informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas levantadas, concordando portanto que o(s) material(is) genético(s) seja(m) utilizado(s) para obtenção de DNA e RNA. Estou ciente de que:

I) A coleta do sangue periférico será feita para este estudo e não causará nenhum problema a mim.

II) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

III) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim;

IV) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que o meu nome não seja mencionado;

V) Se eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VII) Concordo que o(s) material(is) genético(s) seja(m) armazenado(s) no Laboratório de Genética e Biotecnologia no Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, sob a responsabilidade da mestrandia Renata Mendes de Freitas e do Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba, e que seja(m) utilizado(s) para os propósitos desta pesquisa.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20_____.

.....
Responsável pelo (a) menor de 18 anos

Responsáveis pelo Projeto:

Dr Carlos Magno da Costa Maranduba

carlos.maranduba@ufff.edu.br

Prof. Adjunto 1 Laboratório de Genética e Biotecnologia

Instituto de Ciências Biológicas/ UFJF

Biológicas

(32) 2102-3206 ramal 219 e 220

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

CEP HU - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –Hospital Universitário UFJF

Renata Mendes de Freitas

re_plok@hotmail.com

Mestranda em Genética e Biotecnologia

Programa de Pós-graduação em Ciências

(32)8809-4511

ANEXO 3- QUESTIONÁRIO CLÍNICO PARA POLICITEMIA VERA

Data de entrada		Instituição
Médico assistente		
Telefone Contato		

Paciente(Iniciais)	
---------------------------	--

**Please provide only patient initials and remove all patient identifiers on attachments.*

Sexo:	M <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>
Nascimento	(dd/mm /yyyy)	

Critérios Diagnósticos para Policitemia Vera(WHO)*

Critérios Maiores

1- Hgb >18.5 g dl (M)>16.5 g dl⁻¹ (F)

ou

Hgb or Hct >99th percentil de referencia corrigido para idade sexo ou altitude em residencia

ou

Hgb >17 g dl (M),ou>15 g dl (F) se associado com sustentado aumento de ≥ 2 g dl da base que não pode ser atribuida a correção de ferropenia

ou

Aumento de massa de células vermelhas >25% acima da média Normal

2- Presença of *JAK2V617F* ou mutação similar

Critérios Menores

1- Mieloproliferação *trilineage* na Biópsia de Medula Óssea

2- Nivel anormal de EPO

3- Crescimento independente de colônia eritróide (EEC growth)

Diagnóstico de PV requer 1 critério maior e 1 critério menor ou o primeiro critério maior e 2 critérios menores.

Data do diagnóstico:

____ / ____ / ____
(dd) (mm) (yyyy)

Historia do diagnóstico inicial: (continuar em páginas separadas se necessário)

História familiar (outras condições semelhantes na família, mesmo duvidosas)

Tratamentos utilizados:

Hidroxiurea
 Prednisona
 Interferon
 Talidomida
 Sangria
 Outro

Terapia	Dose	Data inicio	Data F

Medicamentos e Condições relevantes:

O paciente teve Trombose ? Sim Não

Condições Clínicas relevantes: NÃO:
 (TGI, Renal, Neurológica, Hepática, Pulmonar etc.)

Informações relevantes

Idade \geq 60:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não				
Leucometria > 10,000 /mm ³	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não				
Plaquetas > 450 000 / mm ³	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não				
Hist;oria de trombose	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não				
Sintomas Constitutionais	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não				
Teste anterior para JAK2 Negative	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	If SIM, results	<input type="checkbox"/> Positive	<input type="checkbox"/>	
Fibrose em BMO	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	Não sabe	<input type="checkbox"/>
ECOG Performance Status	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
Sangrias Independente	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	If Sim,	<input type="checkbox"/> Dependente	<input type="checkbox"/>	
Candidato a transplante	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não				

Resultados (ao diagnóstico, antes de sangrias): Hemograma inicial

Htm: Htc: Hb: VCM:

Leucometria Global:

Plaquetas:

 Baço (tamanho) _____ cm (rebordo costal ao ponto de maior a protrusão esplênica medido por palpação)**Responsável pelo preenchimento:** _____**Data:** ____/____/____

* Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14-22.