

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**IMPACTO DA ANÁLISE MOLECULAR DA MUTAÇÃO *JAK2V617F* NO
DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE
ACORDO COM OS CRITÉRIOS DA OMS 2016**

FABIANE SPAGNOL PEDRAZZANI

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Pedrazzani, Fabiane Spagnol
IMPACTO DA ANÁLISE MOLECULAR DA MUTAÇÃO JAK2V617F
NO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS
CRÔNICAS DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DA OMS 2016 /
Fabiane Spagnol Pedrazzani. -- 2016.
63 f.

Orientador: Maria Lucia Scroferneker.
Coorientador: Ana Paula Alegretti.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Neoplasia Mieloproliferativas. 2. Policitemia
vera. 3. Trombocitemia essencial. 4. Mielofibrose
primária. 5. JAK2V617F. I. Scroferneker, Maria
Lucia, orient. II. Alegretti, Ana Paula, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**IMPACTO DA ANÁLISE MOLECULAR DA MUTAÇÃO *JAK2V617F* NO
DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE
ACORDO COM OS CRITÉRIOS DA OMS 2016**

FABIANE SPAGNOL PEDRAZZANI

Orientadora: Prof^ª Dra Maria Lucia Scroferneker

Coorientadora: Dra. Ana Paula Alegretti

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

*A vida só pode ser compreendida, olhando-se para trás,
mas só pode ser vivida, olhando-se para frente.*

(Soren Kierkegaard)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Sadi e Ieda Spagnol** por todo amor incondicional, apoio, cuidado e preocupação, pois são os responsáveis por tudo o que sou e tudo o que tenho nesta vida, a minha referência em todos os momentos.

À minha amada filha **Valentina**, que se condicionou à minha ausência no tempo destinado a este projeto. A maturidade no entendimento da importância deste trabalho, no auge dos seus 6 anos de idade, foram o fôlego e a coragem para a concretização desta dissertação. Amo-te até o infinito.

AGRADECIMENTOS

À **Drª Maria Lucia Scroferneker** pela orientação, gentileza, colaboração e presteza no desenvolvimento desta dissertação.

À **Drª Ana Paula Alegretti**, pela coorientação, apoio, paciência, compreensão, incentivo, amizade e confiança.

À biomédica **Gislaine Furlanetto**, pelo comprometimento e dedicação para que esse trabalho pudesse ser concretizado.

À minha amiga e colega **Liz Marina Brum**, pelo incentivo diário, pela amizade ímpar, carinho e parceria.

Ao meu marido **Cristiano Pedrazzani**, pelo apoio e cuidado com a nossa filha em todos os momentos que tive que abdicar do convívio familiar.

À **equipe da Citometria de Fluxo da Unidade de Diagnóstico Personalizado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, que me apoiaram em todos os momentos para a realização dessa dissertação. Obrigada a vocês: Mariela, Eloisa, Josefina, Graciele e Juliana.

À **equipe da Biologia Molecular da Unidade de Diagnóstico Personalizado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pelos ensinamentos e dedicação principalmente na parte prática deste trabalho. Obrigada a vocês: Odelta, Rodrigo, Fernanda, Elisa e Denise.

Às colegas e amigas **Lisandra Hartmann, Juliana Furlan e Marina Siebert**, pela ajuda, coleguismo e incentivo nestes 2 anos de convívio.

Ao **Luciano Santos Pinto Guimaraes**, pelo auxílio na análise estatística.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas** pela oportunidade e incentivo ao aperfeiçoamento.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** pela honra e orgulho de ter participado desta instituição.

RESUMO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são um grupo de doenças derivadas de uma transformação clonal de célula tronco hematopoiéticas no qual a linhagem celular mielóide é predominantemente expandida no sangue periférico. As NMPs Philadelphia-negativas incluem policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP) que compartilham muitas características hematológicas, clínicas e evolutivas. A mutação da JAK2 (JAK2V617F) está presente em cerca de 95% dos pacientes com PV, entre 50 a 70% com TE e 40 a 50% com MFP. No entanto, os testes moleculares para diagnóstico são muitas vezes um desafio devido ao alto custo e a disponibilidade de equipamentos especializados. **Objetivo:** Verificar o impacto do teste molecular da mutação JAK2V617F para o diagnóstico de NMPs nos pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Métodos:** Foram avaliados 87 pacientes com suspeita de NMPs. As amostras de sangue periférico foram analisadas para a mutação JAK2V617F pelo método genético molecular de PCR alelo-específico e os resultados correlacionados com os dados clínico-laboratoriais. Para estabelecimento do diagnóstico, foram utilizados os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2016. **Resultados:** Dos 87 pacientes avaliados, 27,6% foram diagnosticados como PV, 39,1% como TE, 4,6% como MFP e 28,7% não contemplavam os critérios para o diagnóstico NMPs. A comparação da utilização do teste da mutação JAK2V617F mostrou que, apenas 41,7% dos pacientes com PV sem utilizar o teste, teriam sido diagnosticados comparados a 91,7% utilizando este teste como um dos critérios no diagnóstico final ($p = 0,004$). Na TE e na MFP, este critério não foi estatisticamente significativo. **Conclusão:** O teste molecular para a mutação de JAK2V617F no nosso hospital teve um impacto significativo no diagnóstico dos pacientes com PV, mostrando ser uma ferramenta importante para o diagnóstico final desta NMP.

Palavras-chave: neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária, JAK2, JAK2V617F.

ABSTRACT

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of disorders derived from a clonal transformation of stem cell on which myeloid cell lineage is predominantly expanded in the peripheral blood. Philadelphia-negative MPNs include polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF) which share many hematological, clinical, and evolutionary characteristics. The JAK2 mutation (JAK2V617F) is present in about 95% of patients with PV, between 50 to 70% with ET and 40 to 50% PMF. However, the molecular diagnostic tests are often a challenge due to the high cost and the availability of specialized equipment. **Objective:** To verify the impact of molecular testing of the JAK2V617F mutation for the diagnosis of MPNs in patients attended at Hospital de Clinics, Porto Alegre. **Methods:** A total of 97 patients were evaluated with suspected of MPNs. The peripheral blood samples were analyzed for the JAK2V617F mutation by the molecular genetic allele-specific PCR method and the results correlated with the clinical-laboratory data. To establish the diagnosis, the 2016 World Health Organization (WHO) criteria were used. **Results:** Of the 87 patients evaluated, 27.6% were diagnosed as PV, 39.1% as ET, 4.6% as PMF and 28.7% did not meet criteria for MPNs diagnosis. Comparison of the use of the JAK2V617F test showed that only 41.7% of patients with PV without the mutation test were diagnosed compared to 91.7% using this test as one of the criteria for the final diagnosis ($p = 0.004$). In the ET and the PMF, this criterion was not statistically significant. **Conclusion:** The molecular test for the JAK2V617F mutation in our hospital had a significant impact in the diagnosis of patients with PV, showing to be an important tool for the final diagnosis of this MPN.

Key words: myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis, JAK2, JAK2V617F.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo	12
Figura 2. Representação esquemática da estrutura primária das quinases Janus (JAKs), compostas pelas quatro regiões: FERM, SH2-like, pseudoquinase e quinase e os sete domínios (JH1 ao JH7)	17
Figura 3. Via JAK/STAT utilizadas por muitas citocinas.....	19
Figura 4. Representação esquemática da localização da mutação V617F.....	20
Figura 5. Papel da JAK2 na via de sinalização em três diferentes situações.....	21
Figura 6. Desenvolvimento da homozigose para a mutação V617F.....	22
Figura 7. Esquema marco teórico.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios da OMS 2016 para Policitemia Vera	26
Tabela 2. Critérios da OMS 2016 para Trombocitemia Essencial	28
Tabela 3. Critérios da OMS 2016 para pré-MFP.....	31
Tabela 4. Critérios da OMS 2016 para MFP.....	32
Tabela 5. Métodos de detecção da mutação JAK2	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(ordenadas alfabeticamente)

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARMS	<i>Amplification Refractory Mutation System</i>
AS-PCR	Reação em cadeia da polimerase - alelo específico (<i>Allele-specific- Polymerase Chain Reaction</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BCR-ABL1	<i>Breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia viral oncogene 1</i>
CALR	Calreticulina
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CSF3R	<i>Colony stimulating factor 3 receptor</i>
dHPLC	<i>denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i>
DIPSS	<i>Dynamic International Prognostic Scoring System</i>
DMPC	Doenças mieloproliferativas crônicas
DMP-like	Doenças mieloproliferativas-like
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Epo-R	Receptores de eritropoetina
FAB	Francês-Americano-Britânico
FERM	<i>Four point one, ezrin, radixin, moesin</i>
G	Guanina
G-CSF-R	Receptor fator estimulador de colônias de granulócitos
g/dL	Gramas/decilitro
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
ILs	Interleucinas
JAK1	<i>Janus Kinase 2</i>
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
JAK3	<i>Janus Kinase 3</i>

JH1	<i>JAK homology 1</i>
JH2	<i>JAK homology 2</i>
JH3	<i>JAK homology 3</i>
JH4	<i>JAK homology 4</i>
JH5	<i>JAK homology 5</i>
JH6	<i>JAK homology 6</i>
JH7	<i>JAK homology 7</i>
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
LEC/SHE	Leucemia eosinofílica crônica/síndrome hipereosinofílica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LNA	Ácido nucléico bloqueado (<i>Locked nucleic acid</i>)
LNC	Leucemia neutrofílica crônica
MF	Mielofibrose
MFP	Mielofibrose primária
μL	Microlitro
mL	Mililitro
MO	Medula óssea
MPL	<i>Myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ng	Nanograma
NMPs	Neoplasias mieloproliferativas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR-RFLP	Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
Ph	<i>Philadelphia</i>
PI3K	<i>Phosphatidyinositol 3 kinase</i>
PPI	Pirofosfato
PV	Policitemia vera

qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo (<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RAS-MAPK	Sistema renina-angiotensina proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Renin angiotensin system mitogen-activated protein kinase</i>)
SH2- like	<i>Src-homology 2</i>
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>
SSP-PCR	<i>Sequence-Specific Primer – Polymerase Chain Reaction</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TE	Trombocitemia essencial
Tpo	Trombopoetina
Tpo-R	Receptor de trombopoetina
TYK2	<i>Tirosina kinase 2</i>
WBC	White blood cell
9pLOH	<i>Loss of heterozygosity of 9p</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	12
2.2. Neoplasias Mieloproliferativas.....	12
2.2.1. Epidemiologia das neoplasias mieloproliferativas Ph ¹ negativas clássicas.....	16
2.3. O Gene JAK2.....	16
2.3.1. A mutação V617F do gene JAK2.....	19
2.3.2. Alelos da mutação V617F.....	21
2.4. Policitemia Vera.....	24
2.5. Trombocitose Essencial.....	26
2.6. Mielofibrose Primária.....	29
2.7. Técnicas Moleculares de Detecção das Mutações do Gene JAK2.....	32
2.7.1. Sequenciamento direto.....	33
2.7.2. PCR em tempo real.....	34
2.7.3. PCR alelo específico (AS-PCR).....	35
2.7.4. qPCR ácido nucleico bloqueado (LNA-qPCR).....	36
2.7.5. Pirosequenciamento.....	36
2.7.6. PCR-RFLP (<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism</i>).....	37
2.7.7. dHPLC (<i>denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i>).....	37
2.7.8. High Resolution Melting (HRM).....	37
3. MARCO TEÓRICO.....	39
4. JUSTIFICATIVA.....	40
5. OBJETIVOS.....	41
5.1. Objetivo Primário.....	41
5.2. Objetivos Secundários.....	41
6. REFERÊNCIAS.....	42
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
10. ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) referem-se a um grupo heterogêneo de doenças das células sanguíneas mielóides que surgem a partir de uma transformação clonal da célula tronco hematopoiética. Esta transformação ocorre devido a diferentes mutações somáticas adquiridas que têm sido descritas nos últimos 10 anos (Tefferi e Pardanani, 2015). Uma das mutações genéticas mais frequentes encontrada nas células das NMPs ocorre na tirosina quinase JAK2 (*Janus Kinase 2*) (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Delhommeau *et al.*, 2006) proteína fundamental envolvida na sinalização celular, tornando-a ativa, mesmo na ausência de sinais estimulatórios (citocinas reguladoras normais da mieloproliferação). Como consequência, ocorre uma superprodução de uma ou mais linhagens de células sanguíneas na medula óssea (MO) e no sangue periférico, associadas clinicamente a um risco de complicações trombóticas, hemorrágicas e evolução à transformação fibrótica ou leucêmica (Campbell e Green, 2006; Swerdlow, 2008).

Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), as principais NMPs, estão divididas em dois grupos: a *BCR-ABL* positiva, que inclui a leucemia mielóide crônica (LMC) e as *BCR-ABL* negativas, as quais a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP) representam os três maiores subtipos, chamadas NMPs clássicas (Swerdlow, 2008; Vainchenker *et al.*, 2011).

O entendimento da patogênese das NPMs clássicas teve grandes avanços em 2005 com a descoberta da mutação da tirosina quinase JAK2, a *JAK2V617F* (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005); (Levine *et al.*, 2005); (Kralovics *et al.*, 2005). O estudo aprofundado desta mutação começou a abrir novos horizontes sobre os mecanismos moleculares da doença, assim como a complexa interação entre genótipo e fenótipo, permitindo observar o fato de uma simples mutação contribuir para três fenótipos distintos (Levine e Gilliland, 2008). Estudos posteriores identificaram outras mutações envolvidas na patogênese molecular destas NMPs como as mutações MPL (*myeloproliferative leukemia*), JAK2 exon 12, CALR (calreticulina), CSF3R (*colony stimulating 3 factor receptor*), porém em

menor frequência (Skoda *et al.*, 2015). Sendo assim, a descrição clínica das doenças, a descoberta e a caracterização dos genes envolvidos, permitiram o desenvolvimento de novas terapias-alvo (Jatiani *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 2014).

A *JAK2V617F* se tornou a mutação somática recorrente mais relevante das NMPs clássicas, estando presente em cerca de 95% na PV entre 50 a 70% na TE e 40 a 50% MFP (Baxter *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Vainchenker *et al.*, 2011).

Devido à importância diagnóstica da mutação *JAK2V617F*, alguns protocolos foram desenvolvidos utilizando a abordagem molecular (Gong *et al.*, 2013). Porém, a realização destes testes na rotina dos laboratórios públicos é um desafio devido ao custo elevado, necessidade de equipamentos específicos e equipe especializada.

O objetivo do presente estudo foi verificar o impacto da realização do teste molecular da mutação *JAK2V617F* dentro dos critérios estabelecidos pela OMS 2016 no diagnóstico das NMPs nos pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados às neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária, mutação envolvendo a JAK2 e métodos diagnósticos para a mutação *JAK2V617F*. A estratégia de busca de informações foi realizada nas bases de dados PubMed e SciELO, além do banco de periódicos da CAPES, no período de 1990 a 2016.

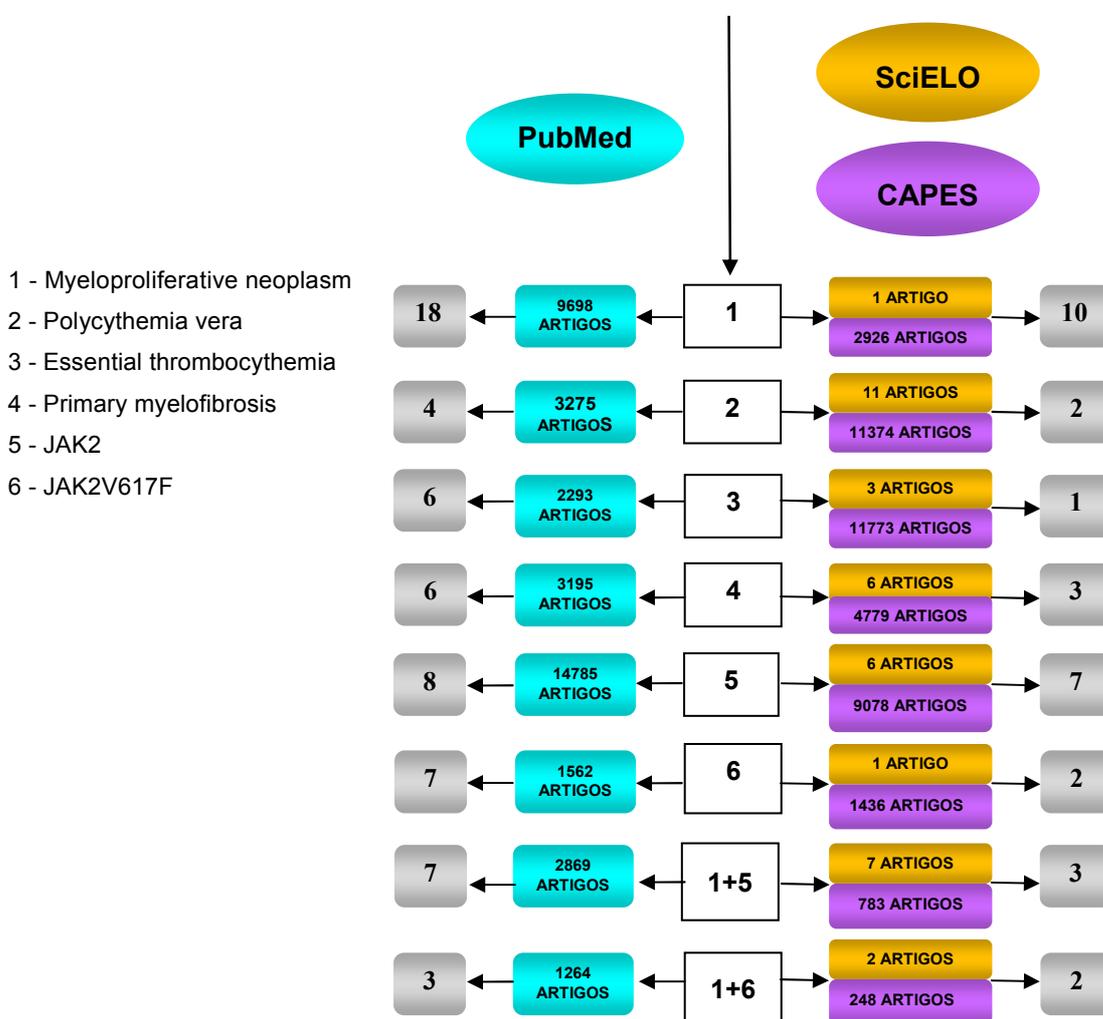


Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Fonte: elaborado pela Autora (2016).

2.2. Neoplasias Mieloproliferativas

O termo “doenças mieloproliferativas crônicas” (DMPC) foi introduzido por William Dameshek em 1951 (Dameshek, 1951) o qual reunia patologias hematológicas com características fenotípicas semelhantes, maturação celular preservada e com hiperproliferação de um ou mais elementos sanguíneos devido a alguns estímulos desconhecidos. Neste conceito, incluía a policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP) leucemia mielóide crônica (LMC) e a síndrome de Di Guglielmo (eritroleucemia).

Um estudo citogenético realizado por Nowell e Hungerford em 1960, identificou a presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph¹) nos pacientes com LMC, sendo posteriormente a patogênese desta leucemia reconhecidamente atribuída à tirosina quinase *BCR-ABL*, resultado da translocação (9;22)(q34;q11) (Nowell e Hungerford, 1960).

Em 1967, Fialkow e cols. (Fialkow *et al.*, 1967) usaram polimorfismos ligados ao X para estabelecer a LMC como uma doença clonal. Após alguns anos técnica semelhante foi aplicada nas doenças mieloproliferativas: PV (1976), MFP (1978) e TE (1978) confirmando a origem comum da célula-tronco no processo clonal (Tefferi, 2008).

Jaroslav Prchal e Arthur Axelrad, em 1974, demonstraram que células da MO de pacientes com PV podiam produzir colônias eritróides *in vitro* na ausência de fator de crescimento, indicando a natureza autônoma destas células, ou seja, sem necessidade da presença de eritropoietina (Prchal e Axelrad, 1974).

Nos anos subsequentes, a compreensão sobre a base molecular de PV, ET e MFP permaneceu inalterada, com exceção de dois estudos em 1998. Silva e cols. observaram que a superexpressão da proteína Bcl-X, da família das proteínas inibidoras de apoptose Bcl-2, nas células progenitoras eritróides da PV, contribuía para a sobrevivência durante a diferenciação independente de eritropoietina, auxiliando na patogênese desta doença (Silva *et al.*, 1998; Kilpivaara e Levine, 2008); e Moliterno e cols. observaram que a expressão reduzida do receptor trombopoietina (MPL) por plaquetas e megacariócitos é

característica da PV e da mielofibrose idiopática, e estaria intimamente ligado ao processo da doença sendo uma nova via no entendimento da patogênese (Moliterno *et al.*, 1998; Kilpivaara e Levine, 2008).

A eritroleucemia descrita por Dameshek foi reclassificada pelo grupo Francês-Americano-Britânico (FAB) em 1976 (Bennett *et al.*, 1976) como leucemia mielóide aguda M6 (LMA-M6) e atualmente é classificada pela OMS como neoplasia mielóide com dois subtipos, a leucemia eritróide/mielóide e a leucemia eritróide pura (Swerdlow, 2008; Mihova, 2012).

A associação do cromossomo Ph¹ com a LMC em 1960 (Nowell e Hungerford, 1960) e o reconhecimento da eritroleucemia como uma variante da leucemia mielóide aguda (LMA) distinguiu as outras três desordens, PV, TE e MFP, como as doenças mieloproliferativas Ph¹ negativas “clássicas” (Tefferi, 2008; Vannucchi *et al.*, 2009) as quais serão abordadas neste estudo.

As doenças mieloproliferativas Ph¹ negativas clássicas possuem a mesma natureza, ou seja, derivam de uma transformação clonal da célula-tronco hematopoiética de linhagem mielóide, a qual é predominantemente expandida no sangue periférico. A elevada massa de células vermelhas define a PV, o elevado número de plaquetas, a TE; e a MFP cursa com fibrose medular, número variável de células mielóides, hematopoese extramedular e hepatoesplenomegalia (Campbell e Green, 2006; Jones e Cross, 2013). Estas três desordens compartilham muitas características hematológicas, clínicas e evolutivas, incluindo hiper celularidade da MO, propensão à trombose e hemorragia, e um risco de transformação leucêmica em longo prazo (Jaffe, 2001; Campbell e Green, 2006).

Um grande impacto no discernimento do mecanismo patogênico das NPMs Ph1 negativas clássicas ocorreu em 2005 com a descoberta de uma mutação no gene JAK2. Quatro grupos de pesquisadores, usando diferentes abordagens, identificaram a primeira anormalidade recorrente nestes pacientes, a mutação V617F (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005).

Quanto à classificação da OMS, a LMC, PV, TE e MFP foram incluídas na categoria de doenças mieloproliferativas crônicas (DMPC) em 2001. Nesta categoria também incluía outras desordens “não clássicas” chamadas de doenças mieloproliferativas-*like* (DMP-*like*) como a leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica/síndrome hipereosinofílica (LEC/SHE), mastocitose e as DMPC não classificadas (Jaffe, 2001; Vannucchi *et al.*, 2009).

Na revisão de 2008 da OMS, a combinação da clínica, características morfológicas e genéticas foi utilizada na tentativa de definir entidades de doenças não só com o objetivo de reconhecimento, mas também para a identificação dos produtos dos genes anormais ou vias que são potenciais alvos de terapia. A nomenclatura de “doenças mieloproliferativas crônicas” foi alterada para “neoplasias mieloproliferativas” (NMP) (Swerdlow, 2008).

Já na revisão de 2016 (Arber *et al.*, 2016), as categorias de NMP não mudaram significativamente, mas as descobertas de novas mutações e melhor compreensão das características morfológicas de algumas entidades têm impactado os critérios diagnósticos das patologias. As novas descobertas quanto as NMP Ph¹ negativas clássicas, têm demonstrado real importância no diagnóstico e/ou prognóstico como:

- (1) a descoberta de novos achados moleculares além das mutações JAK2 e MPL, como a mutação calreticulina (CALR) que comprova a clonalidade, importância diagnóstica e influência prognóstica;
- (2) a PV é possivelmente subdiagnosticada utilizando os níveis de hemoglobina publicados na 4ª edição e a utilidade da morfologia da MO é reconhecida como critério reprodutível para o diagnóstico de PV;
- (3) a necessidade de diferenciar a TE “verdadeira” de pré-MFP;
- (4) os critérios clínicos menores na pré-MFP que podem ter um grande impacto não só na acurácia diagnóstica, mas também sobre o prognóstico;
- (5) critérios morfológicos padronizados das NMPs são importantes para elevar a reprodutibilidade inter-observador dos diagnósticos morfológicos.

2.2.1. Epidemiologia das neoplasias mieloproliferativas Ph¹ negativas clássicas

As NMPs Ph¹ negativas clássicas são patologias essencialmente do adulto (50-70 anos), estando entre as neoplasias hematológicas mais frequentes (Vannucchi *et al.*, 2009). Apesar de poder surgir em qualquer faixa etária, a incidência aumenta com a idade, sendo 50 anos a média de idade ao diagnóstico (Swerdlow, 2008).

Estudos epidemiológicos realizados em alguns países europeus mostraram uma incidência da PV que varia de 0,4 a 2,8 casos em 100.000 pessoas/ano, TE de 0,38 a 1,7 casos em 100.000 pessoas/ano e de mielofibrose (MF) de 0,1 a 1 caso em 100.000 pessoas/ano.

Nos estudos sobre as prevalências em PV, TE e MF há uma grande variação devido aos tipos calculados (taxa de prevalência vs. prevalência período) e a padronização com diferentes populações (população mundial e população europeia).

Segundo a Orphanet, o portal multilíngue sobre doenças raras e medicamentos órfãos, a prevalência de PV é de 30 casos por 100.000 indivíduos, de TE é de 24 casos por 100.000 indivíduos e MF é de 3 casos por 100.000 indivíduos, porém não há período especificado (Moulard *et al.*, 2014).

No Brasil, ainda não há um registro epidemiológico para as doenças mieloproliferativas individualizadas.

2.3. O Gene JAK2

O gene *Janus Kinase 2*, está localizado no braço curto do cromossomo 9 e codifica a proteína JAK2 (Yamaoka *et al.*, 2004; Baxter *et al.*, 2005). Esta é uma tirosina quinase citoplasmática que faz parte da família das quinases Janus, a qual também pertence as proteínas JAK1, JAK3 e TYK2 (*tirosina kinase 2*) (Yamaoka *et al.*, 2004; Schindler *et al.*, 2007).

Conforme ilustrado na Figura 2, as JAKs possuem sete domínios homólogos, numerados do carboxi-terminal em direção ao amino-terminal organizados em quatro regiões:

- JH1 (*JAK homology 1* - domínio quinase);
- JH2 (*JAK homology 2* - domínio pseudoquinase);
- FERM (*four point one, ezrin, radixin, moesin*), composta pelos domínios JH5, JH6, JH7 e metade do JH4;
- SH2-like (*SRC homology 2-like*), formada pela outra metade do JH4 e pelo JH3 (Huang *et al.*, 2001; Yamaoka *et al.*, 2004).

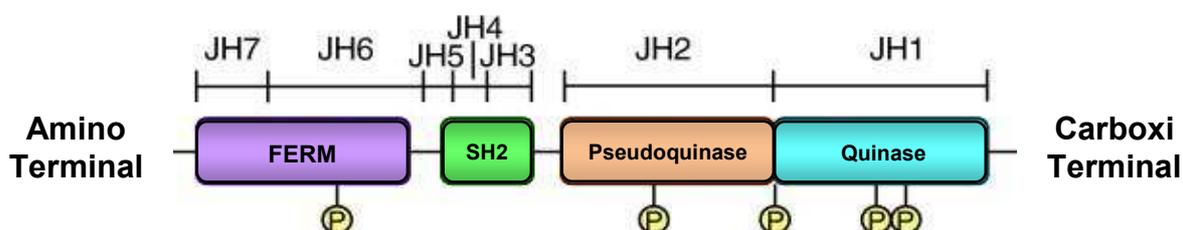


Figura 2. Representação esquemática da estrutura primária das quinases Janus (JAKs), compostas pelas quatro regiões: FERM, SH2-like, pseudoquinase e quinase e os sete domínios (JH1 ao JH7). Adaptado de (Yamaoka *et al.*, 2004).

A disposição em tandem de dois domínios estruturais simétricos, o domínio JH1 e o domínio JH2, é a marca das quinases JAKs. Adjacente ao domínio JH1, a JH2 é uma pseudoquinase ou uma quinase cataliticamente inativa, porém com uma função regulatória essencial da atividade do JH1, demonstrando a semelhança à figura da mitologia romana de duas caras que olham em direções opostas, o deus Janus (Yamaoka *et al.*, 2004).

As JAKs estão ligadas à porção citoplasmática associada com a membrana proximal dos receptores que não possuem domínios intracelulares próprios, conhecidos como receptores JAK-dependentes (Baxter *et al.*, 2005; Hoffman, 2008).

No mecanismo de sinalização celular normal, as células eritróides, leucocitárias e megacariocíticas são estimuladas a crescer e a proliferar quando os fatores de crescimento (citocinas e hormônios) tais como: fatores de

estimulação de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), interleucinas (ILs), eritropoetina (Epo), trombopoetina (Tpo), *interferon- γ* (IFN- γ) e os hormônios de crescimento e leptina (Yamaoka *et al.*, 2004; Waters e Brooks, 2015), se ligam aos receptores JAK-dependentes: receptores de eritropoietina (Epo-R), leucemia mieloproliferativa ou receptor de trombopoetina (MPL ou Tpo-R) e o receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF-R) (Levine *et al.*, 2007; Jatiani *et al.*, 2010; Vainchenker *et al.*, 2011).

A ligação de uma citocina ao seu receptor específico promove uma mudança conformacional nas proteínas JAK2 fazendo com que se aproximem uma das outras, permitindo a ativação de resíduos de tirosina da porção ativa do domínio quinase JH1 por auto e/ou trans-fosforilação (Kisseleva *et al.*, 2002; Yamaoka *et al.*, 2004). Os resíduos fosforilados servem como sítio de ligação para moléculas da família dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição, os STATs (do inglês, *signal transducers and activators of transcription*), além de outras moléculas de sinalização. Em seguida, os STATs ativados entram no núcleo onde atuarão como fatores de transcrição de genes específicos, tais como Bcl-xL, relacionado com a sobrevivência e proliferação e o miR-135a que desempenha um papel nesta via regulando a tradução de proteína JAK2 (Figura 3) (Aaronson e Horvath, 2002; Levy e Darnell, 2002).

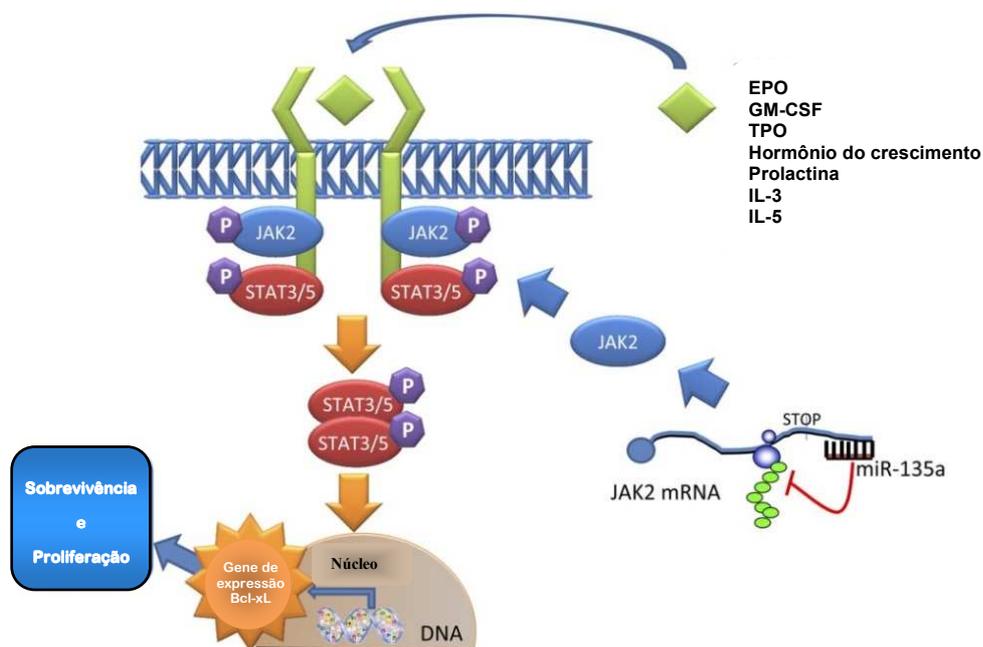


Figura 3. Via JAK/STAT utilizadas por muitas citocinas. Quando um fator de crescimento se liga a um receptor, ocorre a alteração conformacional das JAK2, ativando eventos de fosforilação dessas proteínas que permitem formar dímeros de STAT. Estes dímeros se translocam para o núcleo e ativam transcrição específica de genes. Adaptado de (Navarro *et al.*, 2009).

Portanto a JAK2 desempenha um papel central na sinalização das citocinas mielóides com Epo-R, MPL e G-CSF-R e estes três receptores homodiméricos são expressos em células eritróides, megacariócitos e de linhagem granulocítica, respectivamente (Levine *et al.*, 2007; Vainchenker *et al.*, 2011).

2.3.1. A mutação V617F do gene JAK2

A mutação V617F do gene JAK2 consiste em uma troca do nucleotídeo G (guanina) por uma T (timina) na posição 1849 do *exon* 14 do gene JAK2 (c.1849G>T), resultando na substituição do aminoácido valina por fenilalanina no códon 617 da proteína (Delhommeau *et al.*, 2006; Tefferi, 2006; Levine e Gilliland, 2008).

O aminoácido resultante da mutação está situado no domínio da pseudoquinase JH2 da proteína JAK2 e causa a anulação da função inibitória do domínio JH2 sobre o JH1 como mostrado na Figura 4 (Campbell e Green, 2006; Delhommeau *et al.*, 2006; Tefferi, 2010). Como consequência, a tirosina quinase

correspondente ao domínio JH1 encontra-se em um estado constitutivamente ativado, mimetizando um fator de crescimento hematopoiético e estimulando as várias vias de sinalização como a JAK-STAT, PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol 3 kinase*) e RAS-MAPK (do inglês, *renin angiotensin system-mitogen-activated protein kinase*), culminando com um fenótipo hiperproliferativo (Campbell e Green, 2006; Hoffman, 2008).

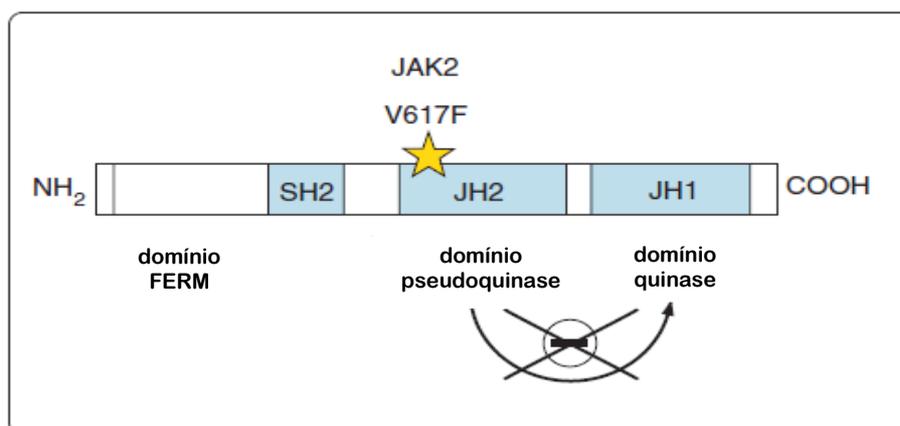


Figura 4. Representação esquemática da localização da mutação V617F. A mutação *JAK2V617F* está destacada pela estrela em amarelo localizada no domínio homólogo JH2 da pseudoquinase *Janus kinase*. A presença da mutação resulta na anulação da função inibitória sobre o domínio homólogo JH1. Adaptado de (Hoffman, 2008).

A JAK2 pode se apresentar em três diferentes situações, como representado na Figura 5. A JAK2 selvagem (*wild-type*), ou seja, sem mutação e sem estímulo da eritropoetina que não ativa a via JAK/STAT; a JAK2 *wild-type* com ligação da eritropoetina no receptor ativando a via de sinalização; e a JAK2 mutada (*JAK2V617F*) sem a presença de eritropoetina ou qualquer citocina, ativando as vias JAK-STAT, P13K e RAS-MAPK conduzindo a uma modulação da transcrição e de proteínas para o ciclo celular, proliferação e fatores relacionados à apoptose (Campbell e Green, 2006).

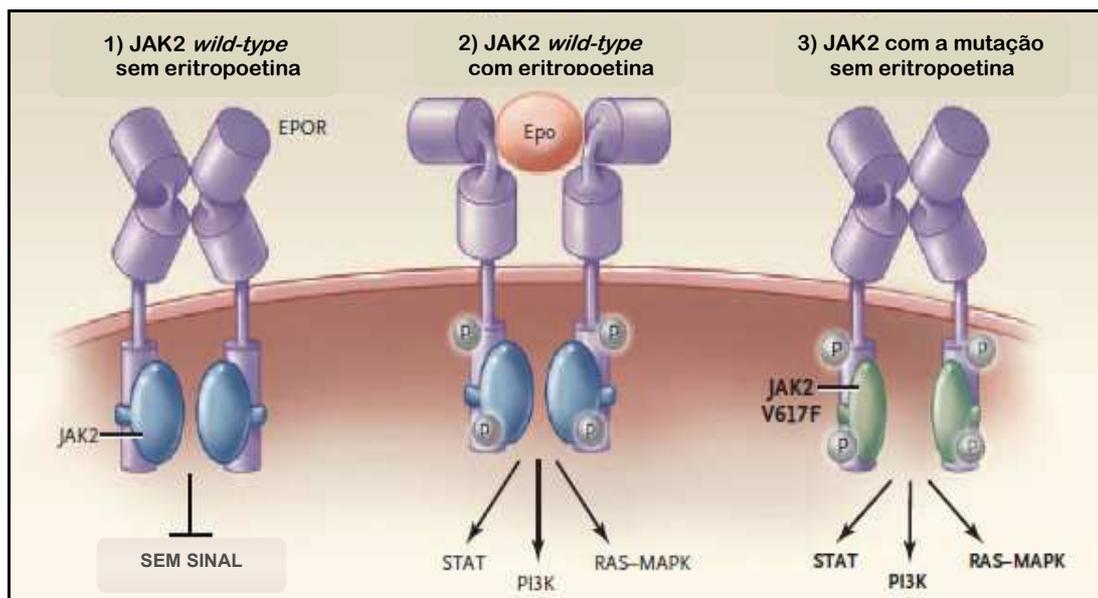


Figura 5. Papel da JAK2 na via de sinalização em três diferentes situações. 1) Modelo de JAK2 selvagem (*wild-type*) sem sinal de ativação da via JAK/STAT. 2) Modelo de JAK2 selvagem com a presença de eritropoetina no receptor, ativando a sinalização da via JAK/STAT. 3) Presença de JAK2 mutada em que mesmo sem a presença de qualquer citocina, ocorre a ativação da via JAK/STAT, do P13K e das vias de sinalização do RAS. Adaptado de (Campbell e Green, 2006).

2.3.2. Alelos da mutação *V617F*

A ocorrência da mutação em uma célula hematopoiética resulta na sua expansão clonal e conseqüentemente em uma progênie de células que são heterozigóticas para *JAK2V617F*. As células heterozigóticas possuem uma vantagem proliferativa em relação às células com JAK2 selvagem. A recombinação mitótica entre as regiões homólogas do cromossomo 9p, entre o *locus* JAK2 e o centrômero, causa então a perda da heterozigose (9pLOH). Uma das células filhas desta recombinação é homozigótica para a mutação e estabelece vantagem seletiva adicional sobre as células heterozigóticas e as células homozigóticas de JAK2 selvagem, dominando completamente a hematopoese (Figura 6) (Kralovics *et al.*, 2005; Passamonti *et al.*, 2006).

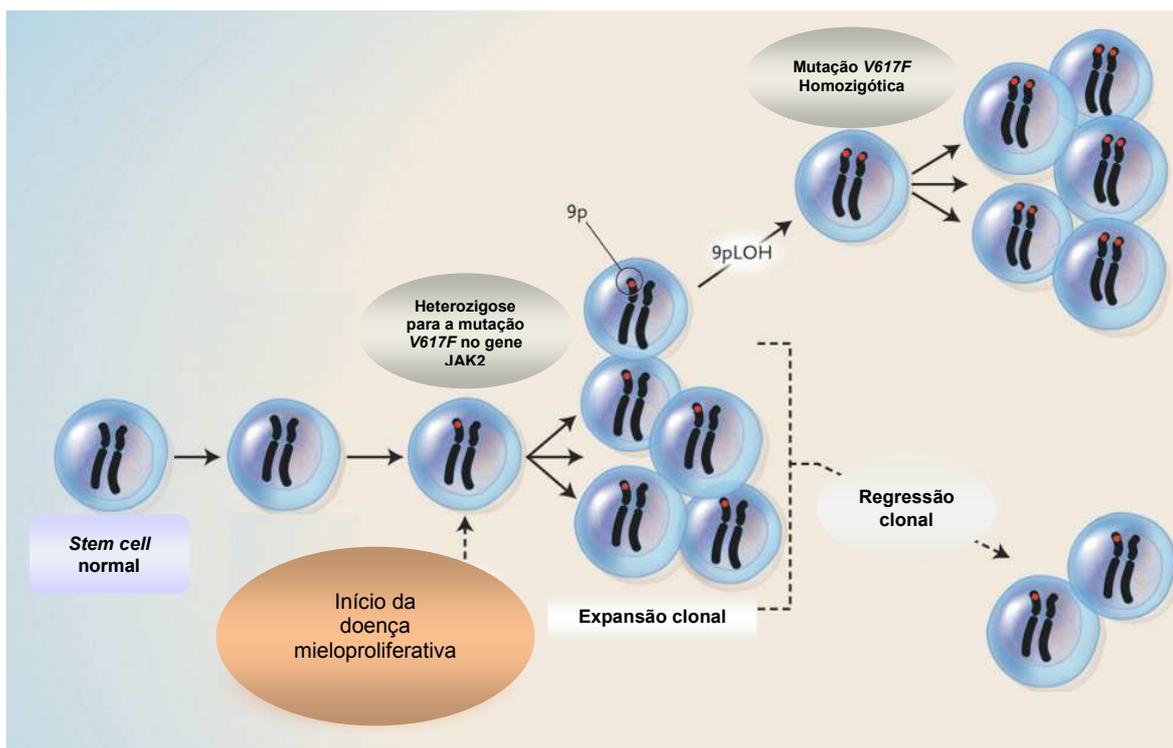


Figura 6. Desenvolvimento da homozigose para a mutação V617F. A mutação V617F de um alelo de JAK2 no cromossomo 9p (ponto vermelho) inicia o aparecimento da doença mieloproliferativa. As células são heterozigotas para a mutação V617F e possuem uma vantagem proliferativa em relação às células com apenas o alelo selvagem (*wild-type*). A recombinação mitótica entre as regiões homólogas dos dois cromossomos 9 em uma célula heterozigótica para V617F resulta na perda da heterozigose de 9p. Uma das células filhas é homozigótica para V617F e com vantagem proliferativa adicional. Esta célula estabelece um subclone que comprime as células que são heterozigotas para V617F e as células que são homozigotas para o tipo JAK2 selvagem. Adaptado de (Kralovics *et al.*, 2005).

Os alelos mutantes *JAK2V617F* caracterizam-se por um aumento progressivo, de 0% para 50% e após, envolve uma transição de 50% para 100%. Quando os alelos mutantes são superiores a 75%, a maioria das células hematopoiéticas (>50%) é, por definição, homozigótica para V617F (Passamonti *et al.*, 2006).

A homozigose na PV e na ET está associada com um estímulo da eritropoiese e mielopoiese, maior incidência de esplenomegalia, maior tamanho do baço e maior proporção de pacientes que necessitam de terapia citoredutora (Vannucchi *et al.*, 2008). Diferenças nas respostas de Epo e Tpo ocorrem entre *JAK2V617F* homozigotos e heterozigotos (Saliba *et al.*, 2013).

Uma questão ainda não esclarecida é como uma única mutação pode ter pelo menos três doenças diferentes. Dados clínicos, biológicos e patológicos levantam uma das hipóteses: a dosagem gênica que postula uma correlação entre o fenótipo da doença e a proporção de alelos mutantes de *JAK2V617F* introduzindo o conceito de carga alélica, isto é, a razão entre o alelo mutante pelo total de alelos nas células hematopoiéticas (Passamonti e Rumi, 2009).

Os pacientes homozigotos apresentam uma maior evolução da doença se comparados aos que possuem carga alélica abaixo de 50%, mostrando que a transformação para homozigose dos clones, requer tempo para que os eventos genéticos ocorram na progressão natural da doença. Presumidamente, as consequências clínicas e funcionais da mutação estão diretamente relacionadas ao número de alelos mutantes ou a proporção de células homozigóticas (ou ambas) (Passamonti *et al.*, 2006; Passamonti e Rumi, 2009).

Há um interesse crescente na quantificação da carga alélica do *JAK2V617F* e sua potencial influência sobre o fenótipo, complicações e evolução das NMPs (Passamonti e Rumi, 2009; Vannucchi *et al.*, 2011). Diferenças substanciais são encontradas na mediana das cargas alélicas *V617F* em granulócitos de sangue periférico entre NMPs individuais. Quantidades mais altas da carga alélica são encontradas na PV, as mais baixas na TE, a maioria dos pacientes com MFP exibem níveis intermediários (Passamonti *et al.*, 2006; Vannucchi *et al.*, 2008).

A carga alélica do *JAK2V617F* tem sido associada a certos fenótipos clínicos, tais como, uma maior incidência de prurido e esplenomegalia e um risco aumentado de trombose em doentes com PV e ET, embora a associação exata entre carga alélica e o resultado em longo prazo, permaneça controversa particularmente em pacientes com MF (Vannucchi *et al.*, 2008).

Existe um consenso de que a presença de elevada carga alélica na PV, onde há uma ativação mais forte das vias de sinalização intracelular, associada com marcadores hematológicos e clínicos definidos, são indicativos de um fenótipo mais agressivo. Por outro lado, uma baixa carga alélica na MF está associada à redução da sobrevida (Vannucchi *et al.*, 2011).

Em resumo, os estudos sugerem que a homozigose para a mutação *JAK2V617F* está associada a uma doença mais sintomática além de ressaltarem a relevância clínica da determinação da carga alélica.

2.4. Policitemia Vera

O termo policitemia é uma tradução literal do grego, "muitas células no sangue" que é caracterizada por um aumento da produção de células vermelhas independente do mecanismo que normalmente regula a eritropoiese (Hoffman, 2008; Swerdlow, 2008).

A PV foi descrita pela primeira vez em 1892, por Louis Henri Vaquez, em um paciente com marcada eritrocitose e hepatoesplenomegalia que considerou ser o resultado de uma proliferação de células hematopoiéticas. Posteriormente, William Osler descreveu um conjunto de pacientes com eritrocitose e esplenomegalia, referindo-se como "doença de Vaquez" (Levine e Gilliland, 2008).

Em 1951, William Dameshek, editor fundador da *Blood* reconheceu que a PV, TE e MFP deveriam ser classificadas como um conjunto de "desordens mieloproliferativas" fenotipicamente relacionadas, dada as dificuldades de distinção entre elas (Dameshek, 1951). Notou que, embora a eritrocitose seja característica da PV, muitos destes pacientes tinham "pancitose" com proliferação de células eritróides, megacariocítica e de linhagem granulocítica. Além disso, observou que os pacientes com PV muitas vezes desenvolviam fibrose medular, alterações leuco-eritroblásticas no sangue periférico e aumento consistente de esplenomegalia com progressão para "mielofibrose terminal".

O curso clínico da PV é caracterizado por uma elevada incidência de complicações trombóticas, desenvolvimento de síndrome mielodisplásica (SMD), MF pós-PV e leucemia aguda que são as causas de morbidade e mortalidade (Finazzi e Barbui, 2007; Swerdlow, 2008).

Três fases da PV podem ser reconhecidas: (1) fase inicial, pré-policitêmica, caracteriza-se por leve eritrocitose; (2) fase policitêmica evidente, associado a um aumento significativo da massa eritrocitária; (3) fase pós-policitêmica,

caracterizada pela “exaustão” da MO, a chamada mielofibrose pós-PV no qual citopenias são associadas a uma hematopoese ineficaz, fibrose medular, hematopoese extramedular e hiperesplenismo (Swerdlow, 2008).

A PV difere de muitas outras doenças malignas hematológicas em que a sobrevivência prolongada é desfrutada pela maioria dos pacientes se a produção excessiva de glóbulos vermelhos e de plaquetas puder ser controlada (Hoffman, 2008).

A média de idade ao diagnóstico é de 60 anos e pacientes jovens abaixo dos 20 anos são raros (Swerdlow, 2008). É considerada uma doença indolente com uma sobrevida média de aproximadamente 14 anos e em pacientes mais jovens, 24 anos (Tefferi e Barbui, 2015). Contudo, em doentes não tratados, a esperança média de vida diminui para 6 a 18 meses (Finazzi e Barbui, 2007).

A descoberta da mutação *JAK2V617F* teve um grande impacto na abordagem diagnóstica do PV. Praticamente quase todos os pacientes com PV (~95%) carregam a mutação somática do gene *JAK2* que resulta em proliferação não só da linhagem eritróide, mas de granulócitos e megacariócitos, a chamada “panmielose” (Swerdlow, 2008; Vainchenker *et al.*, 2011; Tefferi *et al.*, 2014).

Outra mutação, localizada no *exon 12* do gene *JAK2*, é funcionalmente similar a *JAK2V617F*, porém em menor frequência (2-5% dos indivíduos com PV *JAK2V617F*-negativos). Em muitos casos, esses pacientes não apresentam proliferação de células da linhagem granulocítica ou megacariocítica, geralmente observadas em pacientes com PV clássica *JAK2V617F* positiva (Percy *et al.*, 2007; Scott, 2011).

O diagnóstico de PV requer integrações clínicas, laboratoriais e características histológicas da MO. Em 2016, a OMS (Arber *et al.*, 2016) definiu novos critérios de diagnóstico para a PV pois na publicação de 2008, a PV possivelmente era subdiagnosticada utilizando os níveis de hemoglobina definidos. Atualmente para o diagnóstico de PV, deve atender a todos os três critérios maiores ou os primeiros dois maiores e o menor, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Critérios da OMS 2016 para Policitemia Vera

CRITÉRIOS MAIORES		
1. Hemoglobina	>16,5g/dL para homens	>16,0g/dL para mulher
ou		
Hematócrito	>49% para homens	>48% para mulheres
ou		
Aumento da massa eritrocitária > 25% acima do valor normal preditivo		
2. Biópsia de MO mostrando hiper celularidade para a idade com panmielose, proliferação eritróide, granulocítica e megacariocítica com pleomorfismo e megacariócitos maduros		
3. Presença das mutações <i>JAK2V617F</i> ou <i>JAK2 exon 12</i>		
CRITÉRIOS MENORES		
Níveis baixos de eritropoietina sérica		

Fonte: Arber *et al.*, 2016.

Fatores de risco para a sobrevivência incluem: idade avançada, leucocitose e trombose. As taxas de transformação leucêmica em 20 anos são estimadas em <10% e de transformação fibrótica são ligeiramente mais elevadas (Tefferi e Barbui, 2015).

2.5. Trombocitose Essencial

A trombocitemia essencial (TE) é uma neoplasia mieloproliferativa crônica que envolve principalmente a linhagem megacariocítica. É caracterizada por uma persistente trombocitose ($>450 \times 10^9/L$ plaquetas no sangue periférico), aumento do número e do tamanho dos megacariócitos maduros na MO e clinicamente apresenta episódios de trombose e/ou hemorragia (Swerdlow, 2008).

A sobrevivência mediana dos pacientes com TE é de 20 anos, refletindo a natureza mais indolente da proliferação (Tefferi e Barbui, 2015).

Primeiramente foi identificada como uma síndrome clínica distinta por Emil Epstein e Alfred Godel em 1934, no qual pacientes apresentavam trombocitose sem eritrocitose marcada. Em 1951 foi classificada como uma das NMP clássicas baseada na classificação delineada por William Dameshek (Dameshek, 1951; Levine e Heaney, 2008).

O principal regulador fisiológico da trombopoiese é a trombopoetina. Este fator de crescimento atua através da ligação ao seu receptor na superfície celular, o MPL e está envolvido da via de sinalização JAK-STAT, desempenhando um papel importante na renovação hematopoiética das células progenitoras CD34+, diferenciação megacariocítica e formação de plaquetas (Royer *et al.*, 2005; Pecquet *et al.*, 2010; Defour *et al.*, 2013).

O MPL atua controlando a captação e degradação da trombopoetina sérica e a redução da sua expressão ocorre não só na TE, mas também na PV e MFP (Hoffman, 2008).

As mutações somáticas envolvendo o receptor da trombopoetina, a *MPLW515L* e a *MPLW515K*, resultam na ativação da via de sinalização e estão presentes em aproximadamente 1% a 3% dos casos de TE em uma proporção de 60% e 40%, respectivamente (Defour *et al.*, 2013).

Já a mutação da *JAK2V617F* resulta em um ganho de função envolvendo o receptor da trombopoetina que se torna independente de fator de crescimento, além de desenvolver uma hipersensibilidade a trombopoetina estimulando a proliferação e diferenciação de megacariócitos. Esta mutação está presente em 50% a 70% na TE (Baxter *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Koopmans *et al.*, 2012; Tefferi *et al.*, 2014).

No final de 2013, estudos realizados por Klampfl e cols. e Nangalia e cols. identificaram mutações recorrentes no gene que codifica a calreticulina que ocorrem em progenitores multipotentes capazes de diferenciar-se em mielóide e eritróide na maioria dos pacientes com NMPs que não possuíam JAK2 e MPL mutados. Estes achados possuem relevância nos distúrbios envolvendo a linhagem megacariocítica principalmente na TE e MFP (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013).

As características típicas da TE são complicações trombóticas e hemorrágicas, embora a maioria dos pacientes seja assintomática. Acometimentos isquêmicos transitórios, eritromelalgia e síndrome de Budd-Chiari são complicações que podem ocorrer em pacientes com TE ou, antes do

diagnóstico estabelecido. O número de plaquetas extremamente elevado proteolisa o fator de von Willebrand, causando complicações hemorrágicas pela aquisição da doença de von Willebrand.

Alguns pacientes podem desenvolver mielofibrose (<10%) conhecida como mielofibrose pós-TE e apenas cerca de 2% têm o risco de progredir para leucemia mielóide aguda (LMA) (Koopmans *et al.*, 2012).

O diagnóstico de TE deve atender a todos os quatro critérios maiores ou os três primeiros maiores e o menor, definidos pela OMS, conforme Tabela 2 (Arber *et al.*, 2016). Por não haver um marcador específico genético ou biológico, outras causas de trombocitose devem ser excluídas, incluindo outras NMPs, doenças inflamatórias e infecciosas, hemorragias e outros tipos de neoplasias hematopoiéticas e não hematopoiéticas. A presença do gene de fusão *BCR-ABL* exclui o diagnóstico de TE (Swerdlow, 2008).

Tabela 2. Critérios da OMS 2016 para Trombocitemia Essencial

CRITÉRIOS MAIORES

1. Plaquetas > 450 x 10⁹/L.
2. Biópsia de MO mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariocítica com aumento do número e do tamanho, megacariócitos com hiperlobularidade nuclear. Sem aumento significativo ou desvio à esquerda na granulopoiese neutrofilica ou eritropoiese e um muito raro pequeno aumento na fibra reticulínica (grau 1).
3. Ausência dos critérios da OMS para LMC *BCR-ABL*+, PV, MFP, SMD ou outras neoplasias mielóides.
4. Presença das mutações JAK2, CALR ou MPL.

CRITÉRIOS MENORES

Presença de um marcador clonal ou ausência de evidência para trombocitose reativa.

Fonte: Arber *et al.*, 2016.

Em um estudo de mais de 1000 pacientes com TE, o efeito prognóstico negativo (sobrevivência, transformação leucêmica e progressão fibrótica) foi demonstrado na morfologia pré-fibrótica. O estudo também identificou a idade mais avançada, a anemia e a ausência de *JAK2V617F* como fatores de risco para progressão fibrótica e história de trombose e extrema trombocitose como fatores de risco para transformação leucêmica (Barbui *et al.*, 2011).

2.6. Mielofibrose Primária

A mielofibrose primária é uma malignidade hematológica crônica caracterizada, no desenvolvimento total da doença, pela deposição reativa do tecido conjuntivo fibroso e com metaplasia mielóide (Swerdlow, 2008).

O cirurgião alemão, Gustav Heuck (1854-1940) foi o primeiro a descrever MFP, em 1879, sob o título de “Dois casos de leucemia com achados peculiares no sangue e medula óssea”, onde dois pacientes jovens apresentavam esplenomegalia maciça, glóbulos vermelhos nucleados circulantes e aumento do número de leucócitos morfológicamente anormais sendo referidos como “leucemia baço-medular” e “leucemia de puro baço” (Tefferi, 2008).

O termo metaplasia mielóide agnogênica foi usado pela primeira vez em 1940 para essa patologia. Em 2001 a OMS utilizou o termo mielofibrose idiopática crônica e mielofibrose com metaplasia mielóide e em 2006, o *Internacional Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment*, chegaram a um consenso de usar exclusivamente o termo Mielofibrose (Tefferi *et al.*, 2006; Tefferi, 2008).

A mielofibrose pode ser primária (de Novo), ou secundária à PV (MF pós-PV) ou ET (MF pós-ET). O termo NMP associada à mielofibrose tem sido sugerido para abranger todas essas entidades, independentemente se a mielofibrose é primária ou secundária (Reilly *et al.*, 2012; Mughal *et al.*, 2016).

Na MFP, a hiperproliferação de células mielóides e megacariocíticas na MO estimula a proliferação de fibroblastos formando colágeno e fibrose. A doença cursa com duas fases: pré-fibrótica, inicial, com MO hipercelular que evolui até a quase substituição do tecido hematopoético por fibras reticulínicas; e a fase fibrótica (Savona, 2014).

O processo pré-fibrótico cursa com mieloproliferação crônica e hiperplasia megacariocítica atípica, sendo esta, a chave para o reconhecimento deste estágio. Os megacariócitos muitas vezes formam densos aglomerados de

tamanho variável, que são frequentemente adjacentes aos sinus vasculares e aos trabéculos na MO.

Já na fase fibrótica, a biópsia da MO demonstra clara fibrose reticulínica ou colagenosa, resultado de proliferação de fibroblastos não clonais e hiperatividade induzida pelos fatores de crescimento de forma anormal, liberados pelos megacariócitos clonais expandidos (Swerdlow, 2008; Tefferi e Pardanani, 2015). Pode haver hiperplasia focal, mas frequentemente é normocelular ou hipocelular, com manchas de alternância de hematopoese ativa com regiões hipocelulares de tecido conjuntivo frouxo e/ou de gordura. Focos de células imaturas podem ser mais proeminentes, embora os mieloblastos representem menos de 10% das células de MO (Swerdlow, 2008).

A fibrose da MO é a marca da MFP que contribui para o comprometimento da hematopoese levando à anemia grave, esplenomegalia acentuada, hematopoese extramedular e graves sintomas constitucionais (Tefferi e Pardanani, 2015). Dentre as NMPs, a MFP é a que tem maior impacto na qualidade de vida do paciente (Tefferi e Barbui, 2013).

Embora a etiologia da MF seja desconhecida, fatores ambientais podem ser relevantes desde que a MF foi associada em um pequeno número de pacientes expostos à radiação e a agentes petroquímicos, como benzeno e tolueno (Tondel *et al.*, 1995; Bernardini *et al.*, 2005).

O hemograma na MF se caracteriza por um quadro leuco-eritroblástico (eritroblastos em circulação) com hemácias em forma de lágrima ou gota associada com uma MO hipocelular. Há leucopenia ou leucocitose e trombocitopenia ou trombocitose (Swerdlow, 2008; Reilly *et al.*, 2012).

O diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas, anormalidades laboratoriais, características do esfregaço do sangue periférico, morfologia da MO e em características moleculares e citogenéticas (Swerdlow, 2008).

A patogênese da MF envolve a ativação anormal da via de sinalização JAK/STAT e a mutação *JAK2V617F* em pacientes com MFP está presente em

cerca de 40 a 50% com mielofibrose (Baxter *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Vannucchi *et al.*, 2009).

Com a descoberta da mutação *JAK2V617F* em pacientes com NMPs, novas terapias-alvo vêm sendo desenvolvidas, como o ruxolitinibe, inibidor da JAK1 e JAK2 recentemente aprovado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para pacientes com MF e para os resistentes e intolerantes ao tratamento convencional na PV (Verstovsek *et al.*, 2012; Mesa *et al.*, 2013).

Nos pacientes com MFP sem mutações para JAK2 e MPL, verificou-se que a CALR, gene que influencia na proliferação, apoptose, fagocitose e resposta imune, está mutado em 70 a 80%, segundo estudo de Nangalia e cols. (Nangalia *et al.*, 2013) e 88% no estudo de Klampf e cols. (Klampf *et al.*, 2013).

Na suspeita de MFP, a presença de *JAK2V617F* exclui efetivamente a possibilidade de a MO estar associada à fibrose reativa, infecções, processos inflamatórios, toxinas, leucemias de células pilosas, desordens linfóides ou câncer metastático (Levine *et al.*, 2007).

Segundo a OMS de 2016 o diagnóstico da MF fase pré-fibrinolítica ou MFP precoce requer todos os três maiores critérios e pelo menos um critério menor, conforme Tabela 3:

Tabela 3. Critérios da OMS 2016 para pré-MFP:

CRITÉRIOS MAIORES
1. Proliferação e atipia megacariocítica, sem fibrose reticulínica acompanhada pelo aumento da celularidade da MO para a idade, proliferação granulocítica frequentemente diminuição da eritropoiese.
2. Ausência dos critérios da OMS para BCR-ABL1+ LMC, PV, TE, síndrome mielodisplásica ou outras neoplasias mielóides.
3. Presença das mutações JAK2, CALR ou MPL ou ausência destas mutações, presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reativa.
CRITÉRIOS MENORES
Presença de pelo menos um dos seguintes critérios, confirmados em duas determinações consecutivas:
a. Anemia não atribuída a uma condição de comorbidade
b. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$
c. Esplenomegalia palpável
d. LDH elevado (acima do valor de referência do laboratório)

Fonte: Arber *et al.*, 2016.

Para a MFP evidente os critérios diagnósticos requerem todos os três maiores critérios e pelo menos um critério menor, conforme Tabela 4:

Tabela 4: Critérios da OMS 2016 para MFP:

CRITÉRIOS MAIORES

1. Proliferação e atipia megacariocítica, acompanhada por fibrose reticulínica e/ou fibrose colagênica graus 2 ou 3.
2. Ausência dos critérios da OMS para BCR-ABL1+ LMC, PV, TE, síndrome mielodisplásica ou outras neoplasias mielóides.
3. Presença das mutações JAK2, CALR ou MPL ou ausência destas mutações, presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reativa.

CRITÉRIOS MENORES

Presença de pelo menos um dos seguintes critérios, confirmados em duas determinações consecutivas:

- a. Anemia não atribuída a uma condição de comorbidade
- b. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$
- c. Esplenomegalia palpável
- d. LDH elevado (acima do valor de referência do laboratório)
- e. Leucoeritroblastos

Fonte: Arber *et al.*, 2016.

O tratamento inicial de pacientes com MFP é amplamente ditado pelo risco de progressão da doença e sobrevida global, calculada por escores prognósticos como o DIPSS (*Dynamic International Prognostic Scoring System*) e as informações sobre mutações genéticas oferecem dados de prognóstico independente do DIPSS (Tefferi, 2016).

As consequências e complicações médicas associadas à MFP frequentemente resultam na morte prematura por infecção, eventos trombo-hemorrágicos, falência cardíaca ou pulmonar e transformação leucêmica (Mughal *et al.*, 2016).

2.7. Técnicas Moleculares de Detecção das Mutações do Gene JAK2

Atualmente, estão descritas uma variedade de técnicas moleculares para a detecção destas mutações, em particular para a mutação V617F. Estas técnicas incluem sequenciamento direto, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) alelo específico (AS-PCR) ou ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*),

métodos de pirosequenciamento, PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism*), dHPLC (*denaturing High-Performance Liquid Chromatography*), PCR em tempo real (PCR-RT) e análise da curva *melting* (HRM – *High Resolution Melting*). Cada uma destas técnicas tem vantagens e limitações, distinguindo-se pela sua sensibilidade, especificidade, rapidez e custo (Tabela 5) (Steensma, 2006; Qian *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2013).

Tabela 5. Métodos de detecção da mutação *JAK2*:

Método	Sensibilidade (%)	Vantagens	Desvantagens
Sequenciamento Sanger	20	Detecção simultânea de outras mutações.	Baixa sensibilidade; técnica demorada; não quantitativo.
PCR-RT	0.01-5	Alta sensibilidade; alto rendimento; rápido	Detecta apenas mutações alvo. Requer um ciclador em tempo real
PCR (AS)	0.1-1	Alta sensibilidade; simples de executar	Detecta apenas mutações alvo; não é quantitativo; processamento pós-PCR ou é necessário um ciclador
qPCR (AS, LNA)	0.1-0.01	Alta sensibilidade; quantitativo	Detecta apenas mutações alvo
dHPLC	1-2.5	Alto rendimento; rápido	Requer manipulação pós-PCR; tecnicamente desafiador.
HRM	5-10	Simple de executar; semiquantitativo; baixo custo	Sensibilidade moderada a baixa; pouca reprodutibilidade em pequenas amostras.
Pirosequenciamento	5-10	Detecção simultânea de outras mutações; simples de executar; quantitativo; baixo custo	Detecta apenas mutações alvo; sensibilidade relativamente baixa; requer equipamento próprio
RFLP	1-10	Sem equipamento especial; baixo custo	Sensibilidade relativamente baixa; requer manipulação pós-PCR; risco de falso-positivos e falso-negativos; não quantitativo; trabalho intensivo

AS (*allele specific*), alelo específico; LNA (*locked nucleic acid*), ácido nucléico bloqueado.

Fonte: Adaptado de (Huijsmans *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2013).

2.7.1. Sequenciamento direto

A maioria dos relatos originais de *JAK2V617F* estudou a prevalência da mutação por meio de sequenciamento direto do produto amplificado na reação em cadeia da polimerase (PCR) partindo de DNA genômico (James *et al.*, 2005;

Jones *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005) ou de cDNA gerado a partir de mRNA (Kralovics *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

O sequenciamento é tradicionalmente considerado a técnica padrão-ouro usada na detecção de alterações na sequência de DNA devido à observação direta da sequência em análise (Qian *et al.*, 2010). Este método é amplamente utilizado para triagem, avaliação e confirmação de todas as mutações conhecidas e raras da JAK2, o que compensa a menor sensibilidade com um risco mínimo ou inexistente de falso-positivo em casos de baixos níveis de alelos JAK2 (Ma *et al.*, 2009)

Neste método, a reação de extensão é realizada com um molde de DNA amplificado utilizando uma mistura de dNTPs marcados com corante, e o produto é identificado por um detector de fluorescência padrão após eletroforese em gel capilar. Estudos têm demonstrado que na maioria das mutações de ponto, o sequenciamento automatizado não detectará a mutação a menos que existam, pelo menos, 20% de células anormais (Smith *et al.*, 1992; Baxter *et al.*, 2005).

2.7.2. PCR em tempo real

Na biologia molecular, a PCR em tempo real é uma técnica laboratorial baseada na amplificação em processos cíclicos de qualquer sequência de ácido nucleico presente a fim de gerar um grande número de cópias idênticas que podem ser facilmente analisadas (Higuchi *et al.*, 1993).

A PCR é realizada num molde de DNA duplo. São necessários dois oligonucleotídeos que flanqueiam a sequência de DNA a ser amplificada, dNTPs, que são os quatro nucleotídeos trifosfatos (A, T, C, G), uma enzima polimerase termoestável e um tampão com íons magnésio. A reação é realizada por ciclos de temperatura no qual a temperatura alta é aplicada para desnaturar o DNA, seguida da redução da temperatura deixar os *primers* anelarem ao molde e finalmente a temperatura é ajustada em torno de 72°C, o que é ótimo para a enzima polimerase realizar a extensão dos *primers* incorporando os dNTPs.

Esse método pode ser não só qualitativo, mas também quantitativo (qPCR) com um mecanismo de detecção e quantificação através da emissão de fluorescência. Desta forma, a cada ciclo de amplificação são gerados dados, os quais podem ser analisados em tempo real, ao contrário da PCR convencional, em que a análise é realizada somente ao final da reação por eletroforese em gel. A qPCR permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e garantindo maior precisão (Kubista *et al.*, 2006).

2.7.3. PCR alelo específico (AS-PCR)

Há vários métodos que utilizam PCR alelo específico (AS-PCR) em plataformas qualitativas e quantitativas. Possui várias denominações, como por exemplo: ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) baseada no sistema de mutação refratário à amplificação e SSP-PCR (*Sequence-Specific Primer – PCR*) baseada na utilização de iniciadores específicos para a sequência do alelo polimórfico (Steensma, 2006).

O AS-PCR é frequentemente usado na detecção de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), isto é, variações de um único nucleotídeo na sequência de DNA. O princípio desta técnica baseia-se na especificidade da amplificação das sequências de DNA mutadas que é atingida com o uso de um primer específico para a mutação, na reação de PCR. A sequência do primer específico é intencionalmente construída com um erro de sequência (*mismatch*) na extremidade 3', diminuindo a eficiência do anelamento entre o *primer* e as sequências sem o SNP, aumentando assim a especificidade da reação.

É uma das técnicas tradicionalmente mais usadas na detecção da mutação V617F. Foi inicialmente reportada por Baxter *et al.*, em 2005, como uma técnica de diagnóstico para a detecção da mutação V617F com uma sensibilidade de 3% (Baxter *et al.*, 2005). São testes rápidos e acessíveis à maior parte dos laboratórios de diagnóstico molecular. A maior limitação é a impossibilidade de detecção de outras alterações do gene JAK2 (Steensma, 2006).

2.7.4. qPCR ácido nucleico bloqueado (LNA-qPCR)

Técnica de PCR quantitativa que utiliza um oligonucleotídeo modificado com ácido nucleico bloqueado (LNA – *Locked Nucleic Acid*) permite, em combinação com uma sonda de detecção específica de mutação, detectar níveis muito baixos de alelos *JAK2V617F* com uma especificidade de 100% no sangue periférico e em amostras de MO (Sidon *et al.*, 2006).

É um ensaio robusto, altamente específico, fácil de executar e adequado para análise quantitativa com identificação rápida com um tempo menor que a AS-PCR. O método otimizado, permite a quantificação da carga alélica (Denys *et al.*, 2010).

2.7.5. Pirosequenciamento

O pirosequenciamento é um método de genotipagem rápido que depende da liberação de pirofosfato (PPi) sempre que um dNTP complementar correto é incorporado sequencialmente à cadeia de DNA. O PPi serve como um substrato para a subsequente reação de detecção. Na presença de adenosina 5' fosfosulfato, a PPi é quantitativamente convertida em ATP pela ATP sulfúrilase. O ATP conduz à luciferase, mediada pela conversão de luciferina em oxiluciferina, gerando luz visível que pode ser detectada por uma câmera acoplada a um dispositivo. Os dNTP não incorporados e o ATP em excesso são degradados continuamente por outra enzima, a apirase. A ATP sulfúrilase, adenosina 5' fosfosulfato, luciferase, luciferina e apirase são todas partes da mistura de reação de pirosequenciamento (Fakhrai-Rad *et al.*, 2002; Steensma, 2006).

Possui a vantagem de apresentar dados sequenciais "em tempo real", sem um procedimento adicional de análise pós-PCR, e também é semiquantitativo. A última propriedade permite a estimativa da razão alélica no quimerismo hematopoiético (por exemplo, no contexto de pós-transplante de células tronco) ou em amostras de clonalidade mista/tecido heterogêneo, o que é característico de NMPs. (Steensma, 2006)

2.7.6. PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism*)

A PCR do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) é um método que se utiliza da atividade das enzimas de restrição para digerir os produtos amplificados em uma PCR. A mutação *JAK2V617F* abole um sítio de clivagem reconhecido pela enzima BsaXI, derivada da estirpe *Bacillus stearotherophilus* (Baxter *et al.*, 2005). Embora não seja a situação ideal, já que uma reação de clivagem negativa pode corresponder a um falso positivo devido à falha no processo de digestão, a PCR-RFLP é um método simples, de baixo custo e que pode ser usado para uma triagem inicial (Steensma, 2006; Huijsmans *et al.*, 2011). Os resultados alterados devem, no entanto, ser confirmados por outra metodologia.

2.7.7. dHPLC (*denaturing High-Performance Liquid Chromatography*)

O dHPLC pode detectar a mutação genômica do DNA adjacente a *JAK2V617F* de forma confiável e pode detectar mutações com uma proporcionalidade <1 a 2% (Steensma, 2006). No entanto, o dHPLC é tecnicamente desafiador ou de trabalho intensivo ou ambos. Não permite um alto rendimento a um custo adequado para um laboratório clínico, requerem um investimento inicial considerável com equipamentos próprios e possui tecnologia própria com *kits* disponíveis apenas para certas mutações que ainda não incluem alelos JAK2 (Steensma, 2006; Fu *et al.*, 2008; Kannim *et al.*, 2009).

2.7.8. High Resolution Melting (HRM)

A HRM representa uma nova geração de técnicas de PCR, um método simples que analisa a curva de fusão ou dissociação de alta resolução. (Rapado *et al.*, 2009) Consiste em um PCR com a adição de um corante que emite fluorescência ao se intercalar na dupla fita de DNA (fluoróforo). O equipamento de PCR com leitura em tempo real executa a análise de HRM aumentando a temperatura da reação gradativamente a fim de dissociar a dupla fita de DNA e gerar uma curva de decaimento da fluorescência. A diminuição da fluorescência é

captada pelo leitor do equipamento, gerando padrões de curvas (curvas de *melting*) de acordo com os diferentes genótipos. (Wittwer *et al.*, 2003)

3. MARCO TEÓRICO

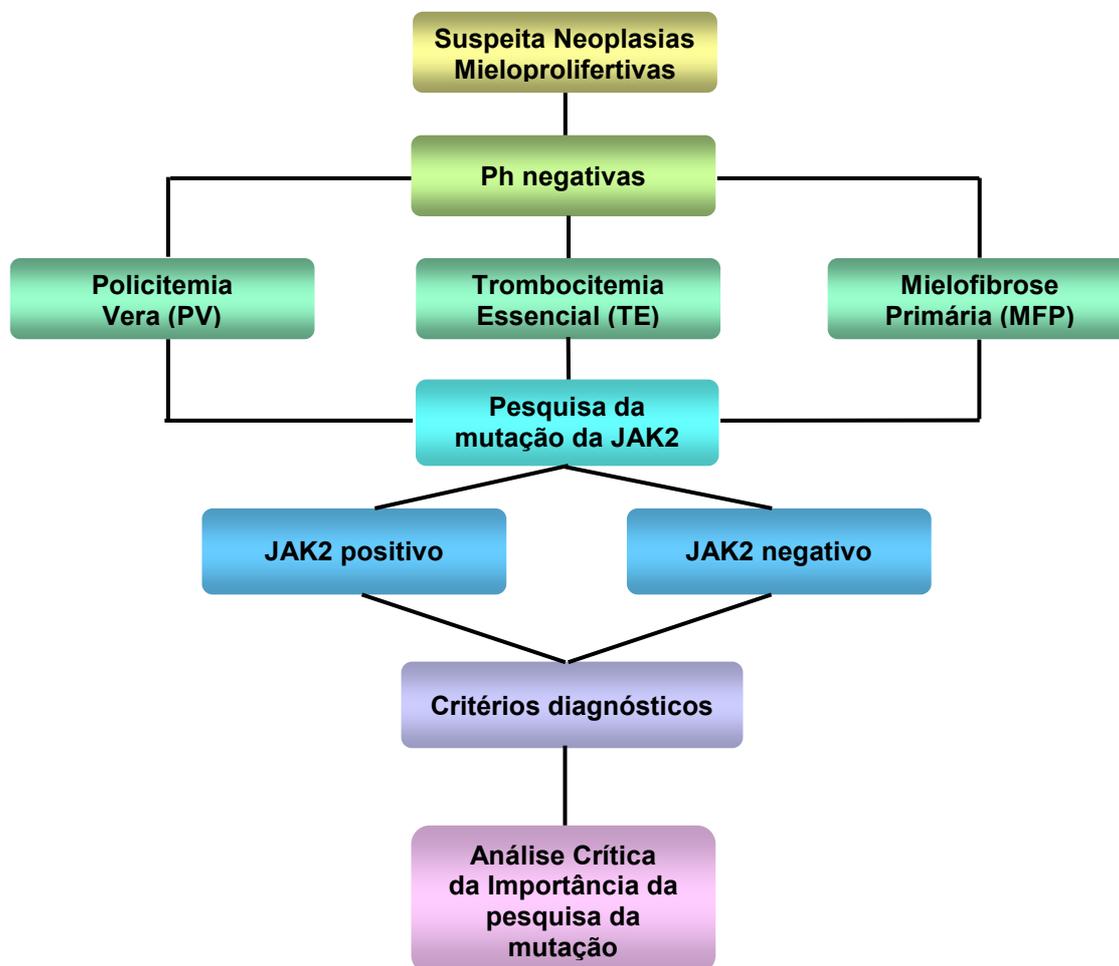


Figura 7. Esquema do marco teórico. Fonte: adaptado pela autora (2016).

4. JUSTIFICATIVA

A identificação de mutações nos genes envolvidos com a fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas representa uma ferramenta eficiente e potencialmente útil para auxiliar o diagnóstico e avaliação do prognóstico de cada paciente. Tendo em vista a presença da mutação da *JAK2V617F* em grande parte dos pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária, torna-se necessário à avaliação de um teste molecular sensível, específico, prático e rápido, para implementação na rotina de um hospital que atende pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS).

A identificação da mutação da *JAK2* é um dos critérios diagnósticos das neoplasias mieloproliferativas; contudo, as análises moleculares são muitas vezes de difícil implantação devido à necessidade de estrutura física especializada, conhecimento técnico avançado e de elevado custo. Como a presença da mutação não está presente em 100% dos casos, um estudo sobre o impacto da realização deste teste para o devido diagnóstico estabelecido em um hospital público é de vital importância para o melhor atendimento aos pacientes e equilíbrio financeiro da instituição.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Primário

Verificar o impacto da realização do teste molecular da mutação *JAK2V617F* segundo dos critérios estabelecidos pela OMS de 2016 no diagnóstico de NMPs em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.2. Objetivos Secundários

1 – Realizar a identificação da mutação *JAK2V617F* em pacientes com suspeita de NMPs em acompanhamento no Ambulatório de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo método molecular PCR alelo específico;

2 – Comparar a classificação das neoplasias a partir dos critérios diagnósticos das NMPs da OMS 2016 sem o teste para a *JAK2V617F* e com o teste para a *JAK2V617F*;

3 – Correlacionar todos os casos positivos para a mutação *JAK2V617F* com a presença da doença estabelecida para avaliar a especificidade do teste.

6. REFERÊNCIAS

- AARONSON, D. S.; HORVATH, C. M. A road map for those who don't know JAK-STAT. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1653-5, May 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040185> >.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 2016. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254> >.
- BARBUI, T. et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 23, p. 3179-84, Aug 2011. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747083> >.
- BAXTER, E. J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1054-61, 2005 Mar 19-25 2005. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781101> >.
- BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, p. 451-8, Aug 1976. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/188440> >.
- BERNARDINI, P. et al. [Myeloproliferative disorders due to the use of gasoline as a solvent: report of three cases]. **Med Lav**, v. 96, n. 2, p. 119-25, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 0025-7818. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16001511> >.
- CAMPBELL, P. J.; GREEN, A. R. The myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v. 355, n. 23, p. 2452-66, Dec 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151367> >.
- DAMESHEK, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. **Blood**, v. 6, n. 4, p. 372-5, Apr 1951. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14820991> >.
- DEFOUR, J. P. et al. Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 7, p. 2540-5, Feb 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359689> >.
- DELHOMMEAU, F. et al. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 24, p. 2939-53, Dec 2006. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17131059> >.
- DENYS, B. et al. A real-time polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive, and specific quantification of the JAK2V617F mutation using a locked nucleic acid-modified oligonucleotide. **J Mol Diagn**, v. 12, n. 4, p. 512-9, Jul 2010. ISSN 1943-7811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431031> >.
- FAKHRAI-RAD, H.; POURMAND, N.; RONAGHI, M. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. **Hum Mutat**, v. 19, n. 5, p. 479-85, May 2002. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11968080> >.
- FIALKOW, P. J.; GARTLER, S. M.; YOSHIDA, A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 58, n. 4, p. 1468-71, Oct 1967. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5237880> >.
- FINAZZI, G.; BARBUI, T. How I treat patients with polycythemia vera. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5104-11, Jun 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17264301> >.

FU, J. F. et al. MassARRAY assay: a more accurate method for JAK2V617F mutation detection in Chinese patients with myeloproliferative disorders. **Leukemia**, v. 22, n. 3, p. 660-3, Mar 2008. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728780> >.

GONG, J. Z. et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology. **J Mol Diagn**, v. 15, n. 6, p. 733-44, Nov 2013. ISSN 1943-7811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23978506> >.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N Y)**, v. 11, n. 9, p. 1026-30, Sep 1993. ISSN 0733-222X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764001> >.

HOFFMAN, R. **Hematology : basic principles and practice**. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2008. ISBN 9780443067136 (hbk.) : '171.00
0443067139 (hbk.) : '171.00
9780443067150 (hbk.) : No price. Disponível em: < Table of contents only
<http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip0818/2008020092.html> >.

HUANG, L. J.; 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. **Mol Cell**, v. 8, n. 6, p. 1327-38, Dec 2001. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779507> >.

HUIJSMANS, C. J. et al. Sensitive detection and quantification of the JAK2V617F allele by real-time PCR blocking wild-type amplification by using a peptide nucleic acid oligonucleotide. **J Mol Diagn**, v. 13, n. 5, p. 558-64, Sep 2011. ISSN 1943-7811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723417> >.

JAFFE, E. S. **Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press ; Oxford : Oxford University Press [distributor], 2001. ISBN 9283224116 (pbk.).

JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1144-8, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793561> >.

JATIANI, S. S. et al. Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. **Genes Cancer**, v. 1, n. 10, p. 979-93, Oct 2010. ISSN 1947-6027. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21442038> >.

JONES, A. V.; CROSS, N. C. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. **Ther Adv Hematol**, v. 4, n. 4, p. 237-53, Aug 2013. ISSN 2040-6207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926457> >.

JONES, A. V. et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 106, n. 6, p. 2162-8, Sep 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15920007> >.

KANNIM, S.; THONGNOPPAKHUN, W.; AUEWARAKUL, C. U. Two-round allele specific-polymerase chain reaction: a simple and highly sensitive method for JAK2V617F mutation detection. **Clin Chim Acta**, v. 401, n. 1-2, p. 148-51, Mar 2009. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135044> >.

KILPIVAARA, O.; LEVINE, R. L. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. **Leukemia**, v. 22, n. 10, p. 1813-7, Oct 2008. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18754026> >.

KISSELEVA, T. et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene**, v. 285, n. 1-2, p. 1-24, Feb 2002. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12039028> >.

- KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med**, v. 369, n. 25, p. 2379-90, Dec 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325356> >.
- KOOPMANS, S. M.; VAN MARION, A. M.; SCHOUTEN, H. C. Myeloproliferative neoplasia: a review of clinical criteria and treatment. **Neth J Med**, v. 70, n. 4, p. 159-67, May 2012. ISSN 1872-9061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641623> >.
- KRALOVICS, R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v. 352, n. 17, p. 1779-90, Apr 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858187> >.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006 Apr-Jun 2006. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460794> >.
- LEVINE, R. L.; GILLILAND, D. G. Myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2190-8, Sep 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779404> >.
- LEVINE, R. L.; HEANEY, M. New advances in the pathogenesis and therapy of essential thrombocythemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 76-82, 2008. ISSN 1520-4391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074062> >.
- LEVINE, R. L. et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 9, p. 673-83, Sep 2007. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721432> >.
- _____. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 387-97, Apr 2005. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837627> >.
- LEVY, D. E.; DARNELL, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 9, p. 651-62, Sep 2002. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209125> >.
- MA, W. et al. Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. **J Mol Diagn**, v. 11, n. 1, p. 49-53, Jan 2009. ISSN 1525-1578. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074595> >.
- MESA, R. A. et al. Effect of ruxolitinib therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 10, p. 1285-92, Apr 2013. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423753> >.
- MIHOVA, D. **ACUTE ERYTHROID LEUKEMIA: A REVIEW**. ZHANG, L.: *N A J Med Sci*. 5: 110-118 p. 2012.
- MOLITERNO, A. R.; HANKINS, W. D.; SPIVAK, J. L. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. **N Engl J Med**, v. 338, n. 9, p. 572-80, Feb 1998. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9475764> >.
- MOULARD, O. et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. **Eur J Haematol**, v. 92, n. 4, p. 289-97, Apr 2014. ISSN 1600-0609. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372927> >.
- MUGHAL, T. I. et al. Contemporary insights into the pathogenesis and treatment of chronic myeloproliferative neoplasms. **Leuk Lymphoma**, v. 57, n. 7, p. 1517-26, Jul 2016. ISSN 1029-2403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27240645> >.

- NANGALIA, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. **N Engl J Med**, v. 369, n. 25, p. 2391-405, Dec 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325359> >.
- NAVARRO, A. et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 114, n. 14, p. 2945-51, Oct 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666866> >.
- NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **J Natl Cancer Inst**, v. 25, p. 85-109, Jul 1960. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14427847> >.
- PASSAMONTI, F.; RUMI, E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. **Haematologica**, v. 94, n. 1, p. 7-10, Jan 2009. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19118374> >.
- PASSAMONTI, F. et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3676-82, May 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373657> >.
- PECQUET, C. et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. **Blood**, v. 115, n. 5, p. 1037-48, Feb 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996410> >.
- PERCY, M. J. et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. **Haematologica**, v. 92, n. 12, p. 1607-14, Dec 2007. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055983> >.
- PRCHAL, J. F.; AXELRAD, A. A. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. **N Engl J Med**, v. 290, n. 24, p. 1382, Jun 1974. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4827655> >.
- QIAN, J. et al. Rapid detection of JAK2 V617F mutation using high-resolution melting analysis with LightScanner platform. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 23-24, p. 2097-100, Dec 2010. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728437> >.
- RAPADO, I. et al. High resolution melting analysis for JAK2 Exon 14 and Exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. **J Mol Diagn**, v. 11, n. 2, p. 155-61, Mar 2009. ISSN 1525-1578. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225136> >.
- REILLY, J. T. et al. Guideline for the diagnosis and management of myelofibrosis. **Br J Haematol**, v. 158, n. 4, p. 453-71, Aug 2012. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22651893> >.
- ROYER, Y. et al. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. **J Biol Chem**, v. 280, n. 29, p. 27251-61, Jul 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899890> >.
- SALIBA, J. et al. Heterozygous and homozygous JAK2(V617F) states modeled by induced pluripotent stem cells from myeloproliferative neoplasm patients. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74257, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24066127> >.
- SAVONA, M. R. Are we altering the natural history of primary myelofibrosis? **Leuk Res**, v. 38, n. 9, p. 1004-12, Sep 2014. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931396> >.
- SCHINDLER, C.; LEVY, D. E.; DECKER, T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. **J Biol Chem**, v. 282, n. 28, p. 20059-63, Jul 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502367> >.

SCOTT, L. M. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. **Am J Hematol**, v. 86, n. 8, p. 668-76, Aug 2011. ISSN 1096-8652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674578> >.

SIDON, P. et al. Combined locked nucleic acid and molecular beacon technologies for sensitive detection of the JAK2V617F somatic single-base sequence variant. **Clin Chem**, v. 52, n. 7, p. 1436-8, Jul 2006. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16798973> >.

SILVA, M. et al. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. **N Engl J Med**, v. 338, n. 9, p. 564-71, Feb 1998. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9475763> >.

SKODA, R. C.; DUEK, A.; GRISOUARD, J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Exp Hematol**, v. 43, n. 8, p. 599-608, Aug 2015. ISSN 1873-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26209551> >.

SMITH, T. A.; WHELAN, J.; PARRY, P. J. Detection of single-base mutations in a mixed population of cells: a comparison of SSCP and direct sequencing. **Genet Anal Tech Appl**, v. 9, n. 5-6, p. 143-5, 1992 Oct-Dec 1992. ISSN 1050-3862. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1296709> >.

STEENSMA, D. P. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. **J Mol Diagn**, v. 8, n. 4, p. 397-411; quiz 526, Sep 2006. ISSN 1525-1578. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931578> >.

STEIN, B. L. et al. Novel myelofibrosis treatment strategies: potential partners for combination therapies. **Leukemia**, v. 28, n. 11, p. 2139-47, Nov 2014. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24888274> >.

SWERDLOW, S. H. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. ISBN 9789283224310 (pbk.) 9283224310 (pbk.).

TEFFERI, A. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 240-5, 2006. ISSN 1520-4391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124067> >.

_____. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. **Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 3-13, Jan 2008. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882283> >.

_____. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. **Leukemia**, v. 24, n. 6, p. 1128-38, Jun 2010. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428194> >.

_____. Somatic JAK2 mutations and their tumor phenotypes. **Blood**, v. 128, n. 6, p. 748-9, Aug 2016. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27516428> >.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Personalized management of essential thrombocythemia-application of recent evidence to clinical practice. **Leukemia**, v. 27, n. 8, p. 1617-20, Aug 2013. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558521> >.

_____. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. **Am J Hematol**, v. 90, n. 2, p. 162-73, Feb 2015. ISSN 1096-8652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25611051> >.

TEFFERI, A. et al. International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia, for the IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1497-503, Sep 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675707> >.

_____. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 16, p. 2507-13; quiz 2615, Oct 2014. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037629> >.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. **JAMA Oncol**, v. 1, n. 1, p. 97-105, Apr 2015. ISSN 2374-2445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26182311> >.

TONDEL, M.; PERSSON, B.; CARSTENSEN, J. Myelofibrosis and benzene exposure. **Occup Med (Lond)**, v. 45, n. 1, p. 51-2, Feb 1995. ISSN 0962-7480. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7703476> >.

VAINCHENKER, W. et al. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1723-35, Aug 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653328> >.

VANNUCCHI, A. M. et al. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. **Leukemia**, v. 22, n. 7, p. 1299-307, Jul 2008. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18496562> >.

VANNUCCHI, A. M.; GUGLIELMELLI, P.; TEFFERI, A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. **CA Cancer J Clin**, v. 59, n. 3, p. 171-91, 2009 May-Jun 2009. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369682> >.

VANNUCCHI, A. M.; PIERI, L.; GUGLIELMELLI, P. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. **Ther Adv Hematol**, v. 2, n. 1, p. 21-32, Feb 2011. ISSN 2040-6207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23556073> >.

VERSTOVSEK, S. et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. **N Engl J Med**, v. 366, n. 9, p. 799-807, Mar 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22375971> >.

WATERS, M. J.; BROOKS, A. J. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. **Biochem J**, v. 466, n. 1, p. 1-11, Feb 2015. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25656053> >.

WITTWER, C. T. et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clin Chem**, v. 49, n. 6 Pt 1, p. 853-60, Jun 2003. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765979> >.

YAMAOKA, K. et al. The Janus kinases (Jaks). **Genome Biol**, v. 5, n. 12, p. 253, 2004. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15575979> >.

ZHAO, R. et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. **J Biol Chem**, v. 280, n. 24, p. 22788-92, Jun 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863514> >.

IMPACT OF THE MOLECULAR TESTING FOR JAK2V617F MUTATION IN THE DIAGNOSIS OF CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS IN ACCORDANCE WITH THE WHO CRITERIA 2016

Fabiane Spagnol Pedrazzani^{1,2}, Ana Paula Alegretti¹, Gislaiane Furlanetto¹, Laura Maria Fogliatto¹, Maria Lucia Scroferneker².

¹ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail of corresponding author: fpedrazzani@hcpa.edu.br

Abstract

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of disorders derived from a clonal transformation of stem cell on which myeloid cell lineage is predominantly expanded in the peripheral blood. Philadelphia-negative MPNs include polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF) which share many hematological, clinical, and evolutionary characteristics. The JAK2 mutation (JAK2V617F) is present in about 95% of patients with PV, between 50 to 70% with ET and 40 to 50% PMF. However, the molecular diagnostic tests are often a challenge due to the high cost and the availability of specialized equipment. **Objective:** To verify the impact of molecular testing of the JAK2V617F mutation for the diagnosis of MPNs in patients attended at Hospital de Clinics, Porto Alegre. **Methods:** A total of 97 patients were evaluated with suspected of MPNs. The peripheral blood samples were analyzed for the JAK2V617F mutation by the molecular genetic allele-specific PCR method and the results correlated with the clinical-laboratory data. To establish the diagnosis, the 2016 World Health Organization (WHO) criteria were used. **Results:** Of the 87 patients evaluated, 27.6% were diagnosed as PV, 39.1% as ET, 4.6% as PMF and 28.7% did not meet criteria for MPNs diagnosis. Comparison of the use of the JAK2V617F test showed that only 41.7% of patients with PV without the mutation test were diagnosed compared to 91.7% using this test as one of the criteria for the final diagnosis ($p = 0.004$). In the ET and the PMF, this criterion was not statistically significant. **Conclusion:** The molecular test for the JAK2V617F mutation in our hospital had a significant impact in the

diagnosis of patients with PV, showing to be an important tool for the final diagnosis of this MPN.

Key words: myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis, JAK2, JAK2V617F.

Introduction

The myeloproliferative neoplasms (MPNs) were introduced by William Dameshek in 1951 (Dameshek, 1951) in which grouped hematologic diseases with similar phenotypic characteristics, including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), primary myelofibrosis (PMF), currently referred to as “classic” Philadelphia (Ph)-negative MPNs (Tefferi, 2008; Vannucchi *et al.*, 2009). All three subtypes share many clinical, haematological and evolutionary features such as hypercellularity of bone marrow (BM), propensity to thrombosis and bleeding; in addition to being associated with a long-term risk of transformation to acute myeloid leukaemia (Jaffe, 2001; Vardiman *et al.*, 2002; Campbell e Green, 2006).

MPNs arise in the hematopoietic stem cell compartment as a result of the acquisition somatic mutations (Tefferi e Pardanani, 2015). The most recurrent abnormality in MPNs is the JAK2V617F point mutation in the Janus Kinase 2 (JAK2), a protein involved in cell signaling transduction pathways such as JAK-STAT. The mutation occurs in all of the myeloid lineages at position 1849 in exon 14, substituting the amino acid valine for phenylalanine at position 617 of JAK2 (V617F). As a consequence, there is an increase in tyrosine kinase activity, even in the absence of stimulatory signals culminating with a hyperproliferative phenotype (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005). This aberrant activation of the JAK-STAT also mediates the activity of inflammatory cytokines, whose levels are commonly increased in myelofibrosis patients (Verstovsek *et al.*, 2010; Tefferi *et al.*, 2011).

The JAK2V617F mutation is present in approximately 95% of PV cases, 50 to 70% of ET and 40 to 50% of PMF (Baxter *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Vainchenker *et al.*, 2011). Further studies have identified other mutations involved in the

molecular pathogenesis of these MPNs, such as MPL (Myeloproliferative leukemia virus oncogene), JAK2 exon 12, calreticulina (CALR), CSF3R (Colony stimulating factor 3 receptor), but less frequently (Skoda *et al.*, 2015).

Due to the diagnostic importance of the JAK2V617F mutation, some protocols were developed using the molecular approach (Gong *et al.*, 2013). However, performing these tests in the routine of public laboratories is a challenge because of the high cost and the need for specific equipment. Therefore the objective of the present study was to verify the impact of performing the molecular test of the JAK2V617F mutation within the criteria established by 2016 WHO in the diagnosis of MPNs in the patients attended at the Hospital of Clinics of Porto Alegre.

Materials and Methods

Samples

We analyzed peripheral blood samples from patients with a clinically suspected diagnosis of classical MPNs attended at a public hospital in Porto Alegre/RS between November 2014 and September 2016. A total of 87 patients (median age: 57; 43% male) were distributed as one of the following: PV (41 cases), ET (42 cases), and PMF (4 cases) and their samples subjected to molecular search of the JAK2V617F mutation by Allele-specific PCR (ipsogen[®] JAK2 MutaSearch[®] Kit). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinics Hospital of Porto Alegre (number of project: 14-0503).

DNA Isolation and Quantification

Genomic DNA was isolated from 0.2 mL of fresh EDTA peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions and nucleic acid were quantified on the NanoDrop One (Thermo Scientific). The amount of DNA was diluted to a concentration of 5ng/ μ L and the reaction was optimized for 25 ng of genomic DNA.

Polymerase Chain Reaction (PCR) procedure

The ipsogen JAK2 MutaSearch kit (Qiagen, Hilden, Germany), detects JAK2 wild type and V617F alleles in genomic DNA, was used according to the manufacturer's protocol. Reactions were performed using the following PCR

program: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 50 cycles of 95°C for 15s and 63°C for 1min 30s. An Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Foster City, CA) was used. The C_T (Cycle Threshold) value for each sample (controls, cutoff sample 'cos', and unknown samples) was calculated. For all samples, the ΔC_T value was ascertained by calculating the difference between the $C_{T\text{ VF}}$ and $C_{T\text{ WT}}$. The grey zone of the test has been defined as $\pm 7\%$ of the $\Delta C_{T\text{ COS}}$. For each unknown sample and control the $\Delta\Delta C_T$ value was calculated by subtracting $\Delta C_{T\text{ SAMPLE}}$ from $\Delta C_{T\text{ COS}}$. If the $\Delta\Delta C_T$ value of the sample is below the ΔC_T value of the cutoff sample minus 7%, the sample was considered negative and if the $\Delta\Delta C_T$ value of the sample is above the ΔC_T value of the cutoff sample plus 7% the sample was considered positive.

Principle of the Procedure - Allele-Specific PCR

The JAK2 MutaSearch assay exploits the qPCR double-dye oligonucleotide hydrolysis principle. During PCR, when the target of interest is present, the probe specifically recovers between the forward and reverse primer sites. When the probe is intact, the proximity of the reporter dye to the quencher dye results in the suppression of the reporter fluorescence, however during the cleavage process, release of the quencher dye occurs and the fluorescence signal emitted by the reporter is detected. Thus, the increase in fluorescence is directly proportional to the target amplification during PCR.

Blood count, Biochemistry data and Myelogram

Data from hemoglobin, hematocrit, WBC count, platelets count, serum erythropoietin, LDH and the myelogram were accessed by electronic medical records.

Statistical analysis

To evaluate the importance of using the JAK2 test in patients with MPNs, the McNemar test was used. A p value <0.05 was considered statistically significant difference. All statistical analyses were performed using SPSS software v.18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

A total of 87 patients were evaluated, 24 (27.6%) were diagnosed as PV, 34 (39.1%) as ET, and 4 (4.6%) as PMF according to the 2016 WHO criteria and laboratory characteristics of these patients summarized in Table 1. The remaining 25 patients (28.7%) did not meet 2016 WHO criteria for MPNs. The results revealed the presence of the JAK2V617F mutation in 47 out of 62 patients with MPNs (75.8%) and the incidences of mutation were 91.7% (22 patients) with PV, 64.7% (22 patients) with ET and 75.0% (3 patients) with PMF.

Table 1.

Laboratory characteristic of patients with MPNs confirmed according to the 2016 WHO criteria. (Arber *et al.*, 2016)

	PV confirmed n = 24	ET confirmed n = 34	PMF confirmed n = 4
Age (years) – median (range)	62.5 (8 – 81)	61 (15 – 82)	52 (41 – 57)
Gender – male/female	11/13	12/22	3/1
Hemoglobin (g/dL) – median (range)	17.7 (10.5 – 22.8)	13.4 (9.6 – 15.7)	11.6 (8.4 – 17.6)
Platelet count ($\times 10^9/\mu\text{L}$) – median (range)	353 (37 – 1135)	679 (183 – 1689)	171 (52 – 391)
WBC count ($\times 10^9/\mu\text{L}$) – median (range)	12.7 (5.6 – 38.1)	7.7 (3.7 – 16.6)	4.4 (3.2 – 20.1)
JAK2V617F positive	22	22	3
JAK2 WT *	2	12	1
Incidence of JAK2 mutation (%)	91.7	64.7	75.0

PV: polycythemia vera; ET: essential thrombocythemia; PMF: primary myelofibrosis

*wild-type; median (range): median (min – max)

When analyzed the impact of the outcome of the molecular test for JAK2V617F mutation, it was evidenced that only 41.7% of the patients with PV would have been diagnosed without the use of the result of the mutation, in comparison to 91.6% when this test as one of the diagnostic criteria in the established disease ($p = 0.004$). Already in the ET and the PMF, this criterion was not statistically significant (Table 2).

Table 2.Comparison of JAK2V617F molecular test use according to 2016 WHO criteria (Arber *et al.*, 2016)

Disorders	Cases Confirmed (n)	Cases confirmed without JAK2V617F assay (cases/total)	Cases confirmed with JAK2V617F assay (cases/total)	P value
PV	24	10/24 (41.7%)	22/24 (91.7%)	0.004
ET	34	22/34 (64.7%)	22/34 (64.7%)	1.000
PMF	4	2/4 (50.0%)	3/4 (75.0%)	1.000

PV: polycythemia vera; ET: essential thrombocythemia; PMF: primary myelofibrosis.

Discussion

In the present study, in patients who had 2016 WHO criteria for one of the MPNs, the JAK2V617F mutation rate was 75.8% (47/63) including, 91.7% in PV, 64.7% in ET and 75.0% in PMF, which was consistent with the scientific literature to PV and ET (ranges: PV, ~95%; ET, 50–70%). However, the PMF rates were higher than those in the scientific literature (range: 40-50%) (Baxter *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Vainchenker e Constantinescu, 2005) probably due to the small number of cases our study that undermines an accurate analysis of the frequency.

Studies published (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005) confirmed that JAK2V617F was not detected in any patients who have not confirmed PV according WHO criteria, giving this parameter a 100% positive predictive value. This finding is the basis to look for the mutation in all patients with erythrocytosis, thus affirming the diagnosis of myeloproliferative disorder of PV type, if JAK2V617F is present. All positive cases for the JAK2V617F mutation of our study, they had the remaining criteria for establishment of the disease in PV, ET and PMF, demonstrating a positive predictive value of 100% for every MPN Ph-negative.

Among the MPNs, PV is the only disease that causes an increase in RBC mass (Spivak e Silver, 2008), whereas ET and PMF do not display a unique clinical and biological characteristics allowing their unequivocal identification when the JAK2V617F mutation is present (Kiladjian, 2012) For example, splenomegaly a

common finding in PMF, is also present in approximately 30% of ET patients therefore the BM biopsy morphology can discriminate between these diseases.(Barbui *et al.*, 2011) Thrombocytosis, which is a key feature of ET, can also be present in some PV or PMF patients (Vardiman *et al.*, 2009) as it was also identified in our study cases of PV with elevated platelets. Therefore the detection of the JAK2V617F mutation seems to be important to provide clear evidence of malignancy that incorporated in a series of clinical and biologic features, allows a final diagnosis (Tefferi *et al.*, 2007).

Although our results of the JAK2V617F mutation test were not statistically significant for the diagnosis of ET and PMF, studies show that the presumption of this mutation, in addition to the confirmation of clonality, may be a risk factor for morbidity and survival in PMF (Barosi *et al.*, 2007) and represents a strong independent risk factor for thrombosis in ET (Carobbio *et al.*, 2011).

In PV, virtually all patients carry hematopoietic cells affected by an activating mutation in the JAK2 protein, JAK2V617F mutation (~ 95%) and mutation located in exon 12 (2-5%).(Percy *et al.*, 2007; Scott, 2011) Therefore, the diagnostic value of detection of the JAK2 mutation in PV is pivotal and is a key feature in the 2016 WHO classification. In our study, were identified 2 patients (8.3%) with confirmed PV in which the JAKV617F result was negative; these patients may be cases with the presence of another mutation, or because they were below the detection limit of 2% V617F allele of the JAK2 MutaSearch ® Kit.

The analysis of the use of the JAK2V617F test in the study by Roda et al (Roda et al., 2014), demonstrated a reduction one type of medical error: the diagnosis of PV in patients with secondary polycythemia showing that the results of JAK2V617F frequently affect the diagnosis by hematologist/oncologist.

According to de study conducted in a Medical Centre of Pennsylvania (Roda and Porat, 2011), only 51,3% (41/80) JAK2V617F positive patients met the criteria to PV by having either a serum erythropoietin level near or below the lower limit of normal, and/or a BM characteristic of PV, concluding that JAK2V617F testing has made a major impact in facilitating the successful delineation of the cause of polycythemia in patients evaluated in a large community.

In addition to the genetic abnormalities in JAK2 have opened new avenues for diagnosing and classifying patients with MPNs, the aberrant activation of the JAK-STAT signaling pathway not only plays an important role in the pathogenesis of these diseases, but also mediating the activity of inflammatory cytokines, whose levels are commonly increased in patients with myelofibrosis resulting in studies regarding target agents (Pardanani, 2008)

After the great discovery of the JAK2V617F mutation in 2005 defined JAK2 as “druggable” target for Ph-negative MPNs (Anand *et al.*, 2011) and many inhibitors of JAK2 have been developed being, until now, only ruxolitinib approved by the FDA (Food and Drug Administration) and the European Commission. (Quintás-Cardama *et al.*, 2010)

Due to the prevalence of JAK2V617F mutation to be different among MPNs Ph negative, real use of this test as diagnostic criteria was debatable, especially in relation to the cost-benefit ratio because it is a test of high cost. In this context, the main finding of this study was the impact of molecular test of JAK2V617F mutation with the 2016 WHO criteria in patients with PV in molecular testing which increased 54.5% to diagnostic confirmation.

Conclusion

In conclusion, the analyses of molecular test of the JAK2V617F mutation in our hospital as one of the criteria established by 2016 WHO had a positive impact showing significant increase in the diagnosis of PV. These findings justify the use of JAK2V617F test in the laboratorial routine as an important tool to help in the correct diagnosis of this MPNs.

Due to the availability of several laboratory techniques for molecular analysis of JAK2V617F and other mutations involved in NMPs, methods can be evaluated in order to define the best technique for use in a laboratory routine. In addition, similar studies are important to evaluation of the other mutations involved in MPNs, such as the MPL and CALR mutations in order to increase the sensibility and specificity for the diagnosis of MPNs and better patient care.

References

- ANAND, S. et al. Increased basal intracellular signaling patterns do not correlate with JAK2 genotype in human myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 6, p. 1610-21, Aug 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653937> >.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 2016. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254> >.
- BARBUI, T. et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 23, p. 3179-84, Aug 2011. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747083> >.
- BAROSI, G. et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 4030-6, Dec 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17712047> >.
- BAXTER, E. J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1054-61, 2005 Mar 19-25 2005. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781101> >.
- CAMPBELL, P. J.; GREEN, A. R. The myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v. 355, n. 23, p. 2452-66, Dec 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151367> >.
- CAROBIO, A. et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. **Blood**, v. 117, n. 22, p. 5857-9, Jun 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490340> >.
- DAMESHEK, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. **Blood**, v. 6, n. 4, p. 372-5, Apr 1951. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14820991> >.
- GONG, J. Z. et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology. **J Mol Diagn**, v. 15, n. 6, p. 733-44, Nov 2013. ISSN 1943-7811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23978506> >.
- JAFFE, E. S. **Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press ; Oxford : Oxford University Press [distributor], 2001. ISBN 9283224116 (pbk.).
- JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1144-8, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793561> >.
- KILADJIAN, J. J. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2012, p. 561-6, 2012. ISSN 1520-4383. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233635> >.
- KRALOVICS, R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v. 352, n. 17, p. 1779-90, Apr 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858187> >.
- LEVINE, R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 387-97, Apr 2005. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837627> >.
- PARDANANI, A. JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. **Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 23-30, Jan 2008. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882282> >.

PERCY, M. J. et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. **Haematologica**, v. 92, n. 12, p. 1607-14, Dec 2007. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055983> >.

QUINTÁS-CARDAMA, A. et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 115, n. 15, p. 3109-17, Apr 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130243> >.

RODA, P. et al. Determination of accuracy of polycythemia vera diagnoses and use of the JAK2V617F test in the diagnostic scheme. **Ann Hematol**, v. 93, n. 9, p. 1467-72, Sep 2014. ISSN 1432-0584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687383> >.

RODA, P. I.; PORAT, E. Impact of Molecular Testing for JAK2 V6^{17F} in the Diagnosis of Polycythemia in An Integrated Community Based Hematology/Oncology Group Practice: **Blood**. 118: 846 p. 2011.

SCOTT, L. M. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. **Am J Hematol**, v. 86, n. 8, p. 668-76, Aug 2011. ISSN 1096-8652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674578> >.

SKODA, R. C.; DUEK, A.; GRISOUARD, J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Exp Hematol**, v. 43, n. 8, p. 599-608, Aug 2015. ISSN 1873-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26209551> >.

SPIVAK, J. L.; SILVER, R. T. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 231-9, Jul 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18401028> >.

TEFFERI, A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. **Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 3-13, Jan 2008. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882283> >.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. **JAMA Oncol**, v. 1, n. 1, p. 97-105, Apr 2015. ISSN 2374-2445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26182311> >.

TEFFERI, A. et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1092-7, Aug 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488875> >.

_____. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 10, p. 1356-63, Apr 2011. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300928> >.

VAINCHENKER, W.; CONSTANTINESCU, S. N. A unique activating mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 195-200, 2005. ISSN 1520-4383. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16304380> >.

VAINCHENKER, W. et al. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1723-35, Aug 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653328> >.

VANNUCCHI, A. M.; GUGLIELMELLI, P.; TEFFERI, A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. **CA Cancer J Clin**, v. 59, n. 3, p. 171-91, 2009 May-Jun 2009. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369682> >.

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2292-302, Oct 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239137> >.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357394> >.

VERSTOVSEK, S. et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. **N Engl J Med**, v. 363, n. 12, p. 1117-27, Sep 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843246> >.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A classificação da OMS define os três tipos distintos de NMPs Ph¹ negativas PV, TE e MFP, com base na conjunção da morfologia da MO, genótipo, dados clínicos e fenótipo. O quadro clínico inicial e as manifestações são altamente variáveis, mostram semelhanças entre diferentes estados reacionais e por este motivo, critérios diagnósticos e exames sensíveis e específicos são desafios atuais na medicina laboratorial.

Recentemente os critérios diagnósticos para PV, TE e MFP foram revisados, sendo que a presença da mutação *JAK2V617F* se manteve como um dos critérios maiores. Apesar de ser o principal marcador genético da patogênese das NMPs Ph¹ negativas, essa mutação não está presente em todos os casos, tornando a implantação da realização do teste molecular questionável em termos de custo-benefício.

Com este trabalho foi possível observar que 54,5% dos pacientes com PV teriam o diagnóstico prejudicado sem a realização do teste para a mutação *JAK2V617F* por não atender os critérios estabelecidos pela OMS 2016. Diante disso, a implantação do teste molecular em um hospital público pode gerar um impacto positivo na assistência ao paciente.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos dados obtidos neste trabalho, foi verificada a importância de ser realizado o teste para mutação *JAK2V617F* na assistência aos pacientes com PV. Devido à disponibilidade de diversas técnicas laboratoriais para análise molecular, é necessário um estudo que avalie outros métodos a fim de definir a melhor técnica para a implantação na rotina laboratorial, além da avaliação da implantação das outras mutações envolvidas nas NMPs, como a mutação da MPL e da CALR.

10. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o Sr (Sra) a participar do estudo “AVALIAÇÃO DE PADRÕES MOLECULARES E IMUNOFENOTÍPICO EM PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS: ESTUDO TRANSVERSAL” que tem como objetivo a identificação das principais alterações cromossômicas e nas células envolvidas na mieloproliferação. A mieloproliferação é uma doença maligna com origem nas células da medula óssea. A produção de glóbulos brancos fica descontrolada e o funcionamento da medula óssea saudável torna-se cada vez mais difícil. Ocorre diminuição progressiva da produção de células normais e o aparecimento de células alteradas e imaturas. Existem muitos tipos de mieloproliferações e alguns respondem bem a determinadas medicações, mas outros não. Por isso, é importante determinar quais as alterações envolvidas na doença.

Sua participação no estudo é voluntária, o que significa que você participará do estudo apenas se quiser.

Serão realizados exames laboratoriais para avaliar as células envolvidas na doença. Este estudo permitirá classificar os vários subtipos da doença e, por conseguinte, planejar o tratamento adequado para os pacientes.

Você não terá benefício direto; contudo, o melhor conhecimento da doença, gerado a partir das pesquisas, e a implantação das novas técnicas propostas possibilitam uma possível melhoria no diagnóstico e acompanhamento da doença.

Informamos que os dados serão obtidos através de consultas aos seus exames, e através da análise laboratorial de amostras de sangue periférico ou medula óssea na nova técnica proposta (teste molecular e citometria de fluxo). Não será necessária nova coleta de sangue, pois será utilizado o material já solicitado habitualmente para exames de rotina. Não são conhecidos riscos aos participantes, havendo, porém o desconforto da dor da picada da agulha e a possível formação de uma mancha roxa no local, após a coleta de sangue dos exames habituais da rotina. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito a esta nova técnica que estamos pesquisando.

O material será utilizado única e exclusivamente para fins do estudo, sendo garantido o anonimato dos indivíduos pesquisados e das informações obtidas. Ao paciente ou seu responsável será garantido o acesso a estas informações e o direito de receber respostas ou esclarecimentos sobre a pesquisa. A decisão de não participar ou de se retirar deste trabalho, a qualquer momento, não trará nenhum prejuízo ao seu atendimento nesta Instituição.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informado (a) de forma clara e detalhado, sobre este estudo. O pesquisador responsável pelo projeto é a Farmacêutica Bioquímica Ana Paula Alegretti, pertencente à Unidade de Diagnóstico Personalizado do Serviço de Patologia Clínica do HCPA, cujos telefones para contato se houver alguma dúvida, é: (51) 3359-7647 e (51) 3359-7779 no caso de dúvidas éticas você poderá contatar o Comitê de Ética e Pesquisa, Fone: (51) 3359-7640.

O participante receberá uma via do presente Termo de Consentimento

Data: ___/___/___

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura do responsável legal: _____

Nome do pesquisador: _____

Endereço do pesquisador: _____

Contato do Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

STROBE

Statement - checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses