

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Genética

Pedro Luiz de França Neto

**Caracterização clínica e molecular de pacientes com neoplasia
mieloproliferativa crônica – cromossomo Ph- negativo**

Recife

2016

Pedro Luiz de França Neto

**Caracterização clínica e molecular de pacientes com neoplasia
mieloproliferativa crônica – cromossomo Ph negativo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto
Lucena de Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos André
Cavalcanti Bezerra

Recife

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

França Neto, Pedro Luiz

Caracterização clínica e molecular de pacientes com neoplasia mieloproliferativa crônica- cromossomo Ph- negativo / Pedro Luiz França Neto. – Recife: O Autor, 2017.

61 f.: il., fig, tab.

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo

Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Tumores 2. Câncer- aspectos moleculares 3. Bioinformática I. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (orient.) II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (coorient.) III. Título

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-316

PEDRO LUIZ DE FRANÇA NETO

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
NEOPLASIA MIELOPROLIFERATIVA CRÔNICA – CROMOSSOMO PH-
NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética, Área de Concentração
Genética, da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Genética.

Aprovado em: 29/07/2016

BANCA EXAMINADORA

Dr. Aderson da Silva Araujo

Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

Dra. Paula Sandrin Garcia

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família, meus pais Ivson e Alceni e meu tio Carlos, pelos ensinamentos que me tornaram a pessoa que sou hoje, meu irmão Caio e minha cunhada Emy, pelos momentos de descontração em casa. E em especial a minha esposa Lidianne, que sempre foi meu porto seguro, minha conselheira e amiga, sempre muito paciente e amorosa, amo você.

A todas as pessoas que fazem parte do Núcleo de Hematologia Laboratorial, que atualmente são minha família no trabalho, torneio-o um compromisso prazeroso por todo o estresse e alegria compartilhados. A Rayssa, Gabi menina, Marlon (os cara), Doguinha, Mayara, Mariana, em especial para Guilhermy, a pessoa que mais gosta de levar pancada que eu conheço, que nunca se negou a ajudar.

A dois greees caras que eu tive a enorme honra de conhecer e trabalhar (beber também, claro), Juan e Diego, que sempre me ensinaram muito, puxaram minha orelha, ajudaram, foram de fato tutores, mesmo sem a intenção me deram muitas lições para vida como, “Se você quiser ser bom, faça por onde, estude e trabalhe muito”, estou muito feliz com o reconhecimento que eles adquiriram como muito esforço e procuro sempre os usar como inspiração, valeu os cara, boa viagem.

Ao professo Marcos Eré que foi o primeiro a abrir a porta do seu laboratório para mim e me aceitar no seu grupo, me ensineo a dar os primeiros passos na minha vida profissional, a ser um profissional organizado e focado.

Ao meu orientador (your grace, hehehe) Antonio Roberto, que muito além de um grande mentor, foi também um amigo, agradeço muito por seus

ensinamentos. Você sempre soube como exigir de cada um de seus alunos. Espero um dia poder ser uma pequena parte do pesquisador que você é.

Ao programa de pós-graduação em genética por todo suporte oferecido e pela excelente equipe docente responsável pela minha capacitação.

Ao CNPq e CAPES pelo financiamento de nossas pesquisas e pela bolsa concedida, que viabilizaram o desenvolvimento deste projeto.

E por fim, a todos que de forma direta ou indireta me fizeram chegar aqui, sou muito grato.

RESUMO

A descoberta da mutação JAK2V617F foi um marco diagnóstico para pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC) – cromossomo Filadélfia (Ph) negativo. Esta mutação encontra-se, presente em quase todos os pacientes com policitemia vera (PV, 97%) e em cerca de 50% dos pacientes com trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP). Posteriormente, outras mutações foram descritas de maneira mutuamente exclusiva, como: alterações no éxon 12 do gene *JAK2*, no gene codificador para receptor da trombopoetina (*MPL*) e no gene calreticulina (*CALR*). Ainda que a caracterização molecular desses pacientes seja uma ferramenta diagnóstica imprescindível, permanece sob estudo as implicações que essas alterações causam no fenótipo da doença. Neste trabalho realizamos a caracterização molecular de 260 pacientes com NMPC Ph-negativo e associamos esses achados às características clínicas e laboratoriais. Para a mutação JAK2V617F, a caracterização molecular foi realizada por meio de reação em cadeia da polimerase seguido por digestão com enzima de restrição (BsaXI). Sequenciamento Sanger foi utilizado para mutações no éxon 12 do gene *JAK2* e no éxon 9 do gene *CALR* utilizamos. A mutação JAK2V617F foi identificada em 87% (60/69) dos pacientes com PV e 50% (94/189) dos pacientes com TE e MFP. As mutações no gene *CALR* foram encontradas em 42% (37/88) dos pacientes com TE e MFP JAK2V617F negativos e para os que também não tinham mutações no gene *CALR* foi feita a pesquisa no gene *MPL*, onde 16/48 apresentaram mutações. Ao associar os achados moleculares com as características clínicas, os pacientes com TE *CALR*^{mut} apresentaram ao diagnóstico maior contagem de plaquetas ($P=0,002$) e menor número de leucócitos ($P=0,016$); nos pacientes com MFP JAK2V617F positivo, a contagem de leucócitos se mostrou aumentada ($P=0,01$) em comparação aos outros grupos. Com nossos dados foi possível caracterizar a coorte quanto ao status mutacional e características clínicas, valideo-a de acordo com os critérios preconizados pela OMS, além de mostrar as diferenças clínicas e laboratoriais existentes com base nos marcadores moleculares diagnósticos, dados que irão auxiliar no acompanhamento e conduta terapêutica dos pacientes.

Palavras-chave: JAK2V617F, CALR, caracterização molecular, implicações clínicas.

ABSTRACT

The discovery of *JAK2V617F* mutation was a hallmark in diagnostic for patients with Myeloproliferative neoplasm (MPN) – Philadelphia (Ph) chromosome negative. Such mutation is present in the majority of patient with polycythemia vera (PV) e about 50% of patients with essential thrombocytemia (ET) e primary myelofibrosis (PMF). Subsequently, other mutations were described in a mutual exclusive manner, such as mutations in exon 12 of *JAK2*, in the *MPL* gene which encoding thrombopoietin receptor e *CALR* gene. Although the molecular characterization of these patients is meatory for diagnosis proposes, it is unclear if these alterations are responsible for the disease phenotype. Here, we performed the molecular characterization of 260 patients with MPN Ph – negative e correlate these findings with clinical e laboratorial features. *JAK2V617F* mutation was perform by polymerase chain reaction – restriction fragmente lenght polymorfism with restriction enzyme (BsaXI). *Sanger* sequencing was applied for screening exon 12 e exon 9 mutation of *JAK2* e *CALR* gene, respectively. *JAK2V617F* mutation was identified in 87% (60/69) of patients with PV e 50% (94/189) in those with ET e PMF. The *CALR* mutation was identify in 42% (37/88) of patients with ET e PMF *JAK2V617F* negative e to which were also negative for *CALR* was performed the analisys of *MPL*. Patients with *CALR^{mut}* ET presented high platelet counts at diagnosis ($p=0,002$) e lower white blood cells (WBC) counts ($p=0,016$). Patients with PMF *JAK2V617F* positive, showed higher WBC counts ($P=0,01$). In summary, we were able to characterize at molecular level our patients, following the WHO criteria; we hope that with such data, we could provide a more reliable genetic lescape for our patients, which we believe to be translate into better management e therapeutic conduct in our setting.

Key-words: *JAK2V617F*, *CALR*, molecular characterization, clinical implications.

Lista de Ilustrações

FIGURA 1. FISIOPATOLOGIA DA JAK2 NAS NMPC.....	23
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DA FISIOPATOLOGIA DO RECEPTOR MPL NAS NMPC-PH NEGATIVO.....	24
FIGURA 3. ALGORITMO DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA DE NMPC.....	28
FIGURA 4. METODOLOGIA EMPREGADA PARA IDENTIFICAÇÃO DA JAK2V617F	33
FIGURA 5. COMPONENTES DO ENSAIO PARA PESQUISA DE MUTAÇÕES W515L/K NO GENE MPL.....	36
FIGURA 6. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE CALR.....	42

Lista de Tabelas

TABELA 1. RESUMO DOS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS EMPREGADOS PARA CADA ENTIDADE.....	27
TABELA 2. PRIMERS E ENZIMA DE RESTRIÇÃO UTILIZADOS PARA A PESQUISA DA JAK2V617F	32
TABELA 3. PRIMERS UTILIZADOS PARA PESQUISA DE MUTAÇÕES NO ÉXON 12.	33
TABELA 4. PROTOCOLO DE CICLAGEM UTILIZADOS PARA PCR DA JAK2	34
TABELA 5. REAGENTES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.	34
TABELA 6. SONDAS DO KIT TAQMAN MUTATION DETECTION ASSAY (LIFE TECHNOLOGIES).....	35
TABELA 7. RESUMO DOS DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.	39
TABELA 8. FREQUÊNCIAS DE MUTAÇÕES NO GENE JAK2 (JAK2V617F E MUTAÇÕES ADICIONAIS NO ÉXON 12).	41
TABELA 9. ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM PV DE ACORDO COM AS MUTAÇÕES NO GENE JAK2.	44
TABELA 10. RESUMO DOS RESULTADOS DE ASSOCIAÇÃO MOLECULAR PARA PACIENTES COM TE.	46
TABELA 11. RESUMO DOS RESULTADOS DE ASSOCIAÇÃO MOLECULAR PARA PACIENTES COM MFP	48

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
A	Adenina
ABL	<i>Abelson Leukemia gene</i>
BCR	<i>Breackpoint cluster region gene</i>
BMO	Biópsia de Medula Óssea
C	Citosina
CALR	Calreticulina
CALR ^{mut}	Calreticulina mutado
EDTA	Ácido diamino tetra acético
EPO	Eritropoetina
G	Guanina
g/dL	Gramas por decilitro
G-CSF	Do inglês, <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	Do inglês, <i>Granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i>
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
IR (1-3)	Do inglês, <i>Inibitory region</i>
JAK2	Janus Kinase 2
JH(1-7)	Do inglês, <i>Jak Homology domain</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MFP	Mielofibrose Primária
MPL	<i>Myeloproliferative Leukemia Virus gene</i>
NMPC	Neoplasia Mieloproliferativa Crônica
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
PCR	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

Ph	Cromossomo Philadelphia
PV	Policitemia Vera
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SP	Sangue periférico
T	Timina
TE	Trombocitemia Essencial
TPO	Trombopoetina
TPOR	Do inglês, <i>Trombopoetin Receptor</i>
U/L	Unidades internacionais por Litro

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS	16
2.1.1 Neoplasias mieloproliferativas crônicas Ph-negativo	18
2.2 MARCADORES MOLECULARES DIAGNÓSTICOS	21
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 CASUÍSTICA	30
4.2 ANÁLISE MOLECULAR	31
4.2.1 Extração de dna genômico	31
4.2.2 Identificação de marcadores de clonalidade	31
4.3 BIOINFORMÁTICA	36
4.3.1 Montagem e avaliação dos <i>contigs</i>	36
4.3.2 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS E DESCRIÇÃO DA COORTE	37
5.2 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM NMPC PH-NEGATIVO	37
5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PACIENTES COM NMPC PH-NEGATIVO	40
5.3.1 Associação dos achados moleculares com características clínicas e laboratoriais	43
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO I	59
APÊNDICE I	60

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC) são doenças hematológicas originadas de alterações clonais na célula-tronco hematopoiética. Caracterizam-se pela proliferação anormal de precursores mieloides, com consequente acúmulo de uma ou mais linhagens de células maduras no sangue periférico e tecidos. As principais consequências clínicas são organomegalia, trombose, hemorragia e potencial evolução para mielofibrose e leucemia aguda.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece como NMPC quatro principais entidades: a leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP). Ainda fazem parte deste grupo: leucemia neutrofílica crônica, leucemia eosinofílica crônica, mastocitose sistêmica e neoplasias mieloproliferativas não classificáveis.

Coletivamente, a incidência anual das NMPC negativas para o rearranjo $t(9;22)/BCR-ABL1$ é de 0,5 a 2,5 casos por 100.000 habitantes/ano. Por convenção, essas neoplasias podem ser reagrupadas segundo mutações e/ou rearranjos de genes codificadores de tirosina quinases, dos quais se destacam a translocação $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ou cromossomo Filadélfia (Ph) que envolve o gene *ABL1*, e principalmente uma mutação envolvendo o domínio regulatório da proteína Janus quinase 2. No primeiro grupo (Ph-positivo), destaca-se a LMC como principal entidade, enquanto que no segundo grupo (Ph-negativo), enquadram-se a PV, TE e MF, as quais estão frequentemente associadas com a mutação *JAK2V617F*.

Embora a descoberta da mutação *JAK2V617F* tenha sido um avanço indiscutível para o diagnóstico das NMPC Ph-negativo, tendo contribuído inclusive para o desenvolvimento de drogas, cerca de 50% dos pacientes com TE ou MF não carregam esta mutação. Este fato estimulou a busca por outros mecanismos moleculares vicinais a via JAK-STAT que permitissem o diagnóstico dos casos *JAK2V617F* negativos.

A busca por outras alterações moleculares nesse grupo de pacientes levou a um melhor entendimento das vias regulatórias envolvidas e a descoberta de mutações em outros genes que estejam, possivelmente, envolvidos na fisiopatologia deste grupo de neoplasias. Assim, foram identificadas mutações no éxon 12 do gene *JAK2* em pacientes com PV e nos genes da *CALR* e *MPL* para o grupo de pacientes com TE e MFP. Apesar de serem considerados

marcadores diagnósticos, especula-se que haja distinção clínica entre os pacientes que carregam mutações diferentes.

Diante do exposto, a caracterização molecular dos pacientes com NMPC Ph-negativo, juntamente com sua associação aos aspectos clínicos e laboratoriais é imprescindível para o entendimento da fisiopatologia da doença assim como a compreensão dos aspectos fenotípicos das diferentes alterações moleculares. Como algumas mutações foram descobertas recentemente e ainda permanece sob estudo o fato de alterações em genes distintos conduzirem a um mesmo fenótipo neoplásico, faz-se necessário estudos de caracterização molecular dessas neoplasias com intenção de gerar hipóteses que possam responder a essas perguntas. O presente projeto tem como objetivo realizar essa caracterização molecular e sua associação aos aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes com NMPC Ph-negativo, com o propósito de contribuir com a comunidade científica para o entendimento dessas neoplasias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

A hematopoese é um processo altamente regulado onde proliferação, diferenciação e morte celular são controlados por uma rede de citocinas que dita estes processos para as células tronco hematopoéticas. Este tipo celular tem a capacidade de, através de divisões assimétricas originar uma célula idêntica a ela para manter a reserva de células tronco e uma que será capaz de dividir e maturar terminalmente de acordo com o estímulo recebido. Quando há uma perturbação na coordenação desses processos a homeostase é interrompida culminando no acúmulo de células imaturas ou maduras na medula óssea e sangue periférico além de órgãos secundários do tecido hematopoético ocasionando diversos tipos de malignidades hematológicas (WARR; PIETRAS; PASSEGU??, 2011).

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC) são doenças clonais das células-tronco hematopoiéticas, caracterizadas pela proliferação descontrolada de células maduras mielóides, independente dos estímulos reguladores fisiológicos. Essa produção desordenada conduz ao acúmulo de uma ou mais linhagens maduras mielóides no sangue periférico e tecidos podendo ocasionar um quadro de organomegalia. Essa classe de neoplasias hematológicas possui início insidioso de curso crônico e apresentam tendência variável para desenvolvimento de eventos trombóticos e evolução para um quadro de mielofibrose ou leucemia aguda (Tefferi e Vardiman 2008; Wadleigh e Tefferi 2010; Kvasnicka 2013; Milosevic e Kralovics 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece oito entidades de NMPC distintas. Dentre elas, destacam-se a Leucemia Mieloide Crônica (LMC), que foi a primeira dessas neoplasias a se ter conhecimento de sua alteração molecular aplicado a produção de uma terapia alvo com êxito (DRUKER, 2001). Fisiopatologicamente a LMC é caracterizada pela presença da proteína truncada BCR-ABL originada pela translocação t(9;22)(q34.1;q11.2) ou cromossomo Ph, que leva ao desencadeamento das vias de proliferação, diferenciação e inibição da apoptose. Além desta, há outras entidades não associadas à presença do cromossomo Ph, como a Policitemia Vera (PV),

Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP), Leucemia Neutrofílica Crônica, Leucemia Eosinofílica Crônica, Mastocitose Sistêmica e Neoplasia Mieloproliferativa Inclassificável, recebendo maior destaque a PV, TE e MFP por suas frequências (Tefferi e Vardiman 2008; Wadleigh e Tefferi 2010). Apesar de serem classificadas como entidades distintas, compartilham características fisiopatológicas, clínicas e histológicas, que dificultam o diagnóstico diferencial em fases iniciais (Vardiman e Hyjek 2011).

Por convenção, essas neoplasias podem ser reagrupadas segundo mutações e/ou rearranjos de genes codificadores de tirosina quinases, dos quais se destacam o gene *ABL1*, frequentemente associado à translocação cromossômica t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR-ABL1* ou cromossomo Filadélfia (Ph), e o gene *Janus quinase 2 (JAK2)*, envolvendo principalmente uma mutação somática no domínio regulatório da proteína Janus quinase 2, que consiste na substituição de uma valina por fenilalanina na posição 617 desta proteína (*JAK2V617F*). Sendo assim agrupadas em NMPC Ph-positivo para os casos de LMC e NMPC Ph-negativo, onde enquadram-se a PV, TE e MFP, as quais estão frequentemente associadas à mutação *JAK2V617F* (Tefferi & Vardiman 2008; Vardiman et al 2009; Klampfl T et al 2013).

Apesar de ser considerado um evento oncogênico importante para as NMPC Ph-negativo, a mutação *JAK2V617F* possui etiopatologia desconhecida para TE e MFP, fato que se baseia em sua frequência, em que pacientes com PV, gira em torno de 95%, enquanto que nos pacientes com TE e MFP, está presente em aproximadamente 50% dos pacientes (BAXTER et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005; ZHAO et al., 2005). No intuito de fornecer um quadro mais completo das vias envolvidas na fisiopatologia das NMPC Ph-negativo, mutações em outros genes foram pesquisadas (KLAMPFL et al., 2013; NANGALIA et al., 2013; PARDANANI et al., 2006; SCOTT et al., 2007a).

Deste modo, foram identificadas mutações adicionais no éxon 12 do gene *JAK2* para pacientes com PV e nos genes *CALR* e *MPL* para o grupo de pacientes com TE e MFP. Essas mutações correspondem a aproximadamente 99% dos pacientes com PV (mutações em *JAK2*) e de 80 a 90% dos pacientes com TE e MFP que possuem mutações em um dos marcadores moleculares (*JAK2V617F*, éxon 9 do *CALR* ou éxon 10 do *MPL*) (KLAMPFL et al., 2013;

NANGALIA et al., 2013; PIKMAN et al., 2006; SCOTT et al., 2007b). Mesmo com as descobertas moleculares envolvidas na patogênese dessas neoplasias, ainda não há um tratamento alvo-específico com a mesma eficácia que como para o grupo de pacientes com LMC (PARDANANI et al., 2013; VANNUCCHI et al., 2015). Ademais, a conduta terapêutica dos pacientes NMPC Ph-negativo ainda é um desafio, devido, sobretudo, à dificuldade na predição do desenvolvimento dos principais fatores de risco para as entidades, como trombose (especialmente para pacientes com PV e TE), hemorragia (pacientes com PV) e fibrose medular (pacientes com MFP)(Barbui et al. 2013a; Finazzi et al. 2013; Pontus Lundberg e Axel Karow 2014).

2.1.1 Neoplasias mieloproliferativas crônicas Ph-negativo

As NMPC Ph-negativo compõem um grupo de neoplasias, das quais três se destacam por suas frequências, Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP). São caracterizadas por uma proliferação descontrolada dos componentes precursores da hematopoiese que conservam a capacidade de diferenciação celular terminal, neste processo dá-se origem aos principais componentes mieloides do sangue (eritrócitos na PV, megacariocítico na TE e granulocítico na MFP)(Tefferi e Vardiman 2008; Wadleigh e Tefferi 2010). Essa proliferação descontrolada ocorre devido a aquisição de mutações somáticas e ao estabelecimento de hematopoiese clonal, que garante vantagem proliferativa a célula-tronco leucêmica. Esses eventos genéticos geralmente levam à ativação constitutiva de vias de sinalização celular que amplificam a resposta induzida por fatores de crescimento hematopoiéticos (Vainchenker e Constantinescu 2012; Quintás-Cardama e Verstovsek 2013).

A identificação dos marcadores clonais permitiu a atribuição de um critério diagnóstico objetivo, o primeiro identificado foi a mutação JAK2V617F (BAXTER et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005; SCOTT et al., 2005; ZHAO et al., 2005). A descoberta desta mutação é reconhecida como o paradigma fisiopatológico das NMPC Ph-negativo, uma vez que atribuiu alterações na via JAK-STAT como a base molecular destas neoplasias (GRISOUARD et al., 2015; KVASNICKA, 2013).

O comprometimento na via JAK/STAT, previamente identificada baseada na mutação *JAK2V617F*, permitiu a identificação de outras alterações que possuem reflexo sobre a via JAK/STAT. Entre estas alterações destacam-se as mutações no gene do receptor da trombopoietina (*MPL*), mutado em aproximadamente 10% dos casos de TE e MFP (LABASTIDA-MERCADO et al., 2015; PARDANANI et al., 2006; TEFFERI; NOEL; HANSON, 2011). Recentemente, mutações no gene *CALR* foram descritas para esse grupo de pacientes diagnosticados com TE ou MFP negativos para mutações em *JAK2* e *MPL* (KLAMPFL et al., 2013; NANGALIA et al., 2013). Atualmente essas alterações são utilizadas como marcadores diagnóstico para as NMPC Ph-negativo e permitem a atribuição de um marcador clonal a, virtualmente, todos os pacientes com PV (mutações no gene *JAK2*) e aproximadamente 80 a 90% dos pacientes com TE e MFP (Barbui et al. 2013b; Tefferi e Pardanani 2016).

O diagnóstico destas entidades é baseado, sumariamente, na identificação das alterações clínicas e laboratoriais recorrentes e, mais recentemente, na identificação dos marcadores clonais (Tefferi 2014; Tefferi e Pardanani 2016). A pesquisa destas mutações são, portanto, indispensáveis à abordagem diagnóstica, contudo, a investigação destes marcadores como moduladores das variáveis clínicas nas NMPC ainda não foi realizado a contento, e tem recebido especial atenção da literatura especializada (Quintás-Cardama e Verstovsek 2013; Them e Kralovics 2013; Savona et al. 2015).

Apesar de pertencerem a um mesmo grupo de neoplasias e assim possuírem algumas características sobrepostas que por vezes dificultam o diagnóstico, as NMPC Ph-negativos possuem aspectos clínicos e laboratoriais que as distinguem. A Policitemia Vera é uma NMPC progressiva e clonal, com início frequentemente insidioso, caracterizado pelo aumento da massa eritrocitária acompanhado, eventualmente, de leucocitose, plaquetose e esplenomegalia (BARBUI et al., 2013; GEYER et al., 2014). Vale ressaltar que essa proliferação é independente de eritropoietina, principal hormônio regulador da eritropoiese e esse aumento pode ser acompanhado pelo aumento de leucócitos e plaquetas, quadro conhecido como panmielose. A etiopatologia da doença é atribuída a uma desregulação da via tirosina cinase *JAK2*, responsável pela transdução de sinais ligados a receptores que regulam a hematopoiese, entre eles o receptor da eritropoietina (BARBUI et al., 2015; LEVINE et al., 2005;

NEMER; GRANDIS; BRUSSON, 2014). Essa alteração é causada, majoritariamente, pela mutação *JAK2V617F*, e menos frequentemente por mutações no éxon 12 do *JAK2*.

Os pacientes são habitualmente assintomáticos sendo diagnosticados após algum evento trombo-hemorrágico ou durante um exame laboratorial realizado com outra finalidade. Cerca de 30 a 40% dos pacientes apresentam sintomas constitucionais, dos quais destacam-se a: cefaleia, prurido, fraqueza, sudorese e tontura. Os eventos trombo-hemorrágicos ocorrem principalmente pelo aumento da celularidade em sangue periférico, sobretudo a eritrocitose, plaquetose e a maior adesão destas células ao endotélio vascular (PASSAMONTI; MORA; MAFFIOLI, 2016). Desta maneira, a agilidade com que se executa o diagnóstico evita o desenvolvimento de complicações decorrentes desses eventos, como o acidente vascular cerebral ou complicações cardiovasculares, associado ao risco aumentado de evolução para mielofibrose e/ou leucemia aguda (TEFFERI, 2015a; ZHANG; LI; LAI, 2014).

A TE é uma NMPC Ph-negativo caracterizada pelo aumento, persistente e sustentado de etiologia desconhecida das plaquetas em sangue periférico ($\geq 450 \times 10^9/L$), profunda hiperplasia megacariocítica na medula óssea com eventos pontuais de trombose e hemorragia (Lekovic et al. 2015; Tefferi 2015). Como não há um marcador diagnóstico específico, outras causas de plaquetose necessitam ser excluídas, inclusive outras NMPC (RUMI et al., 2014a). A presença de sinais e sintomas é bastante variável nesta entidade, vários pacientes conseguem atenção médica fortuita, após resultado elevado da contagem de plaquetas durante um hemograma de rotina. Queo sintomáticos os pacientes apresentam complicações decorrentes de eventos cardiovasculares associados a episódios hemorrágicos e/ou trombóticos (ENBLOM et al., 2015; FINAZZI; DE STEFANO; BARBUI, 2013). A complicação mais frequente nesses pacientes são os eventos trombóticos, que ocorrem em 12 de cada 1000 pacientes por ano enquanto que na MFP essa frequência é de 1-6 de cada 1000/ano (HARRISON et al., 2010).

Das três NMPC Ph-negativo mais frequentes, a MFP é a de pior curso clínico. É uma doença hematológica maligna, de caráter crônico, caracterizada em sangue periférico pelo quadro leucoeritroblástico patognomônico, que consiste na presença anômala de células mieloides imaturas e precursores

eritroides, alteração morfológica dos eritrócitos com presença de dacriócitos (hemácias em formato de lágrima), leucocitose e/ou citopenias (Tibes e Mesa 2014; Tefferi et al. 2014). Organicamente, como reflexo de hematopoese extramedular, o principal sinal observado é a esplenomegalia, associado a deposição de fibra reticulínica e colágena na medula óssea. Pode ocorrer *de novo* ou secundária a outra NMPC, como PV ou TE (MF pós-PV/TE), sem quaisquer diferenças histopatológicas que as distingam (KVASNICKA, 2013) . Os pacientes com MFP possuem risco aumentado de desenvolverem eventos hemorrágicos e trombóticos, bem como, de evolução clonal a síndromes mielodisplásicas (SMD) e leucemia mieloide aguda (LMA) (Gangat et al. 2011; Finazzi et al. 2013; Guglielmelli et al. 2014). As principais causas de morte nesta neoplasia são as comorbidades relacionadas, como os eventos cardiovasculares e as decorrentes da citopenia (sangramentos e infecções) além de evolução para leucemia aguda (GANGAT et al., 2011; TEFFERI, 2014).

2.2 MARCADORES MOLECULARES DIAGNÓSTICOS

Atualmente as principais mutações envolvidas diretamente na fisiopatologia da PV, TE e MFP compreendem os genes *JAK2* (éxon 12 e éxon 14), *CALR* (éxon 9) e *MPL* (éxon 10) e são utilizadas como marcadores diagnósticos para a doença (Tefferi e Pardanani 2016). A primeira mutação descrita e também a mais frequente envolve o gene *JAK2* (*JAK2V617F*) sendo encontrada em quase todos os pacientes com PV e em cerca de metade dos pacientes com TE e MF (JAMES et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005; SCOTT et al., 2005; ZHAO et al., 2005). Subsequente a descoberta da mutação *JAK2* V617F outras alterações foram identificadas no gene *JAK2*, compreendendo o éxon 12 (SCOTT et al., 2007b). O segundo gene em ordem cronológica a ser relacionado aos pacientes com TE e MFP foi o que codifica o receptor de trombopoietina (*MPL*). Mutações nesse gene são relatadas em cerca de 3% dos pacientes com TE e 7% dos pacientes com MFP (PARDANANI et al., 2006; PIKMAN et al., 2006). Recentemente, a descoberta de mutações no gene *CALR* em pacientes com TE e MFP (20 a 25%) que não possuíam qualquer dos marcadores acima citados, preencheu uma lacuna diagnóstica importante (TEFFERI et al., 2014d). Mutações em *JAK2*, *CALR* e *MPL* são, em geral,

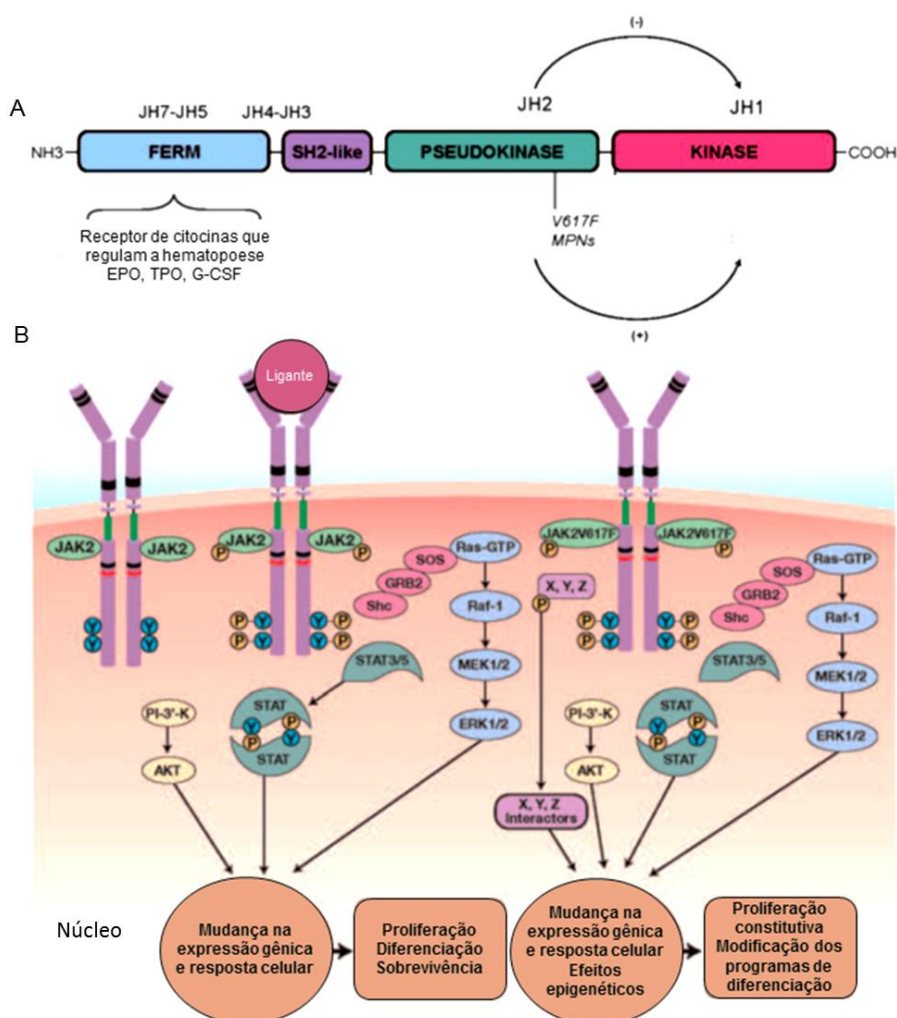
mutuamente exclusivas, com raros casos de co-ocorrência(MCGAFFIN et al., 2014; MURUGESAN et al., 2016; XU et al., 2014).

O gene *JAK2* codifica uma proteína tirosino quinase envolvida na via de sinalização *downstream* dos receptores que respondem a sinais de proliferação e diferenciação celular, nos progenitores mieloides(ZIEMIECKI; HARPUR; WILKS, 1994). A principal mutação no gene *JAK2* envolvida nas NMPC é a *JAK2V617F*. Essa alteração ocorre no éxon 14 e leva a substituição de uma valina por uma fenilalanina na posição 617 (p.Val617Phe). Isso faz com que a proteína torne-se constitutivamente ativada, causeo uma proliferação da célula que a possui(KRALOVICS et al., 2005; SCOTT et al., 2005).

A Janus quinase 2 possui 7 domínios conservados (JH1-7), na porção carboxi-terminal há os domínios JH1 e JH2 (domínio cinase e pseudocinase, respectivamente). O JH1 contém os domínios catalíticos, enquanto que o JH2 possui efeito inibitório no domínio cinase. Dessa forma a atividade do domínio JH1 é regulada pelo domínio JH2, que impede uma ativação indiscriminada. No domínio pseudokinase são conhecidas três regiões inibitórias: IR1 (619 – 670), IR2 (725 – 757) e IR3 (758 – 807). A mutação *JAK2V617F* impede assim, a função da IR1, o que leva a uma ativação constitutiva do domínio kinase pela falta de regulação do pseudokinase (Figura 1) (Al-Lazikani et al. 2001; Vainchenker e Constantinescu 2012).

Outra alteração do *JAK2* associada a NMPC são as mutações no éxon 12. Esse éxon está numa área imediatamente adjacente ao domínio regulatório da proteína, o que corrobora a hipótese de que há uma ativação constitutiva por falha na inibição. Essas mutações ocorrem em cerca de 2- 3,5% dos pacientes com PV e não são reportadas em pacientes com TE ou MFP (SCOTT, 2011; SCOTT et al., 2007b).

Figura 1. Fisiopatologia da JAK2 nas NMPC. A) Estrutura sequencial da proteína JAK2, em que se nota a proximidade entre os domínios JH1 e JH2. Fisiologicamente, o domínio pseudoquinase (JH2) exerce controle negativo sob o domínio catalítico JH1. A mutação V617F causa um dano que impede JH2 exercer sua função. O domínio “FERM” é a região responsável pela ligação dos fatores que regulam a hematopoese, aqui listados como Eritropoietina (EPO), Trombopoetina (TPO) e Fator Estimulante de Colônias Granulocíticas (G-CSF). A sinalização constitutiva da JAK2, mediada pela mutação V617F, torna, portanto, a célula independente destes fatores de crescimento. As mutações no éxon 12 também comprometem a função do domínio JH2. **B)** Cascata de sinalização regulada pela ativação da JAK2. Sumariamente, a ativação da sinalização pelo ligante, deflagra sinais de proliferação via proteínas STATs. A vantagem proliferativa conferida pela JAK2V617F é o paradigma para compreensão da patogênese das NMPC Ph-negativo, uma vez que justifica a proliferação celular descontrolada e a inibição de sinais pró-apoptóticos.

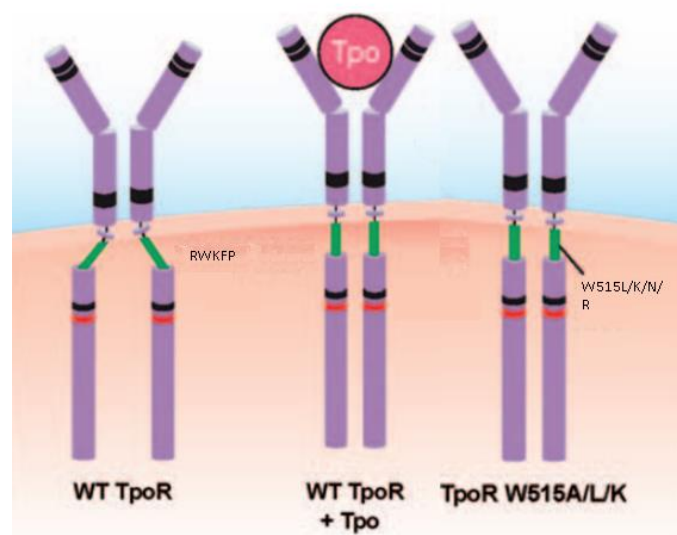


FONTE: Modificado de Vainchenker & Constantinescu 2012.

O receptor de trombopoetina (TPOR) que é codificado pelo gene *MPL* (myeloproliferative leukemia vírus oncogene) é expresso em plaquetas, células tronco hematopoiéticas e progenitores precoces. Quando estimulado pela trombopoetina libera sinais críticos de sobrevivência e proliferação celular.

(CHALLIER et al., 2002). O TPOR não apresenta atividade intrínseca de cinase, porém encontra-se intimamente ligado, pela sua porção intracitoplasmática à JAK2 (Wen, Q. 2011). A maioria das mutações que levam a um crescimento independente de trombopoetina nas NMPC ocorrem no éxon 10 do *MPL*, envolvendo o triptofano no códon 515 (W515) resulte na sua substituição por lisina, leucina, asparagina e arginina (W515K, W515L, W515N e W515R, respectivamente) (PARDANANI et al., 2006; PECQUET et al., 2012; PIKMAN et al., 2006). Esse triptofano faz parte de uma estrutura de aminoácidos (RWQFP) localizada na região intracelular logo após o domínio transmembranar que impede a ativação espontânea do receptor (STAERK et al., 2006). Quando mutado ele induz a ativação da via de sinalização JAK-STAT (Akpinar, TS. 2013) (Figura 2). A frequência dessas mutações nos pacientes *JAK2V617F* negativos é em torno de 5% nos pacientes com TE e 10% nos pacientes com MFP (Tefferi 2013; Rumi et al. 2014b; Tefferi e Pardanani 2016).

Figura 2. Representação da fisiopatologia do receptor MPL nas NMPC Ph-negativo. A ligação da causa uma mudança conformacional no RTPO que através da JAK2 inicia os sinais de proliferação e diferenciação celular. Quando há mutação no éxon 10 do *MPL* há uma perda na capacidade de regulação da ativação do RTPO, levando a ativação constitutiva via JAK2.



FONTE: Modificado de Vainchenker, 2013.

Recentemente mutações somáticas no gene *CALR* foram identificadas em pacientes com NMPC *BCR-ABL1* negativo que não possuíam mutações nos genes *JAK2* ou *MPL* (KLAMPFL et al., 2013; NANGALIA et al., 2013). Este gene está localizado no cromossomo 19, possui 9 éxons e é responsável por codificar uma proteína chaperona multifuncional ligante de cálcio, frequentemente

localizada no retículo endoplasmático (GOLD et al., 2010). A proteína possui três domínios distintos: I - o domínio N-terminal que é capaz de ligar lectinas e possui uma sequência de endereçamento da proteína ao RE; II- é uma região de conexão rica em prolina (domínio-P); III- trata-se da região C-terminal, que por seu caráter ácido, tem afinidade aumentada ao cálcio. Além do que, o domínio C-terminal possui uma sequência de aminoácidos (KDEL), responsável pela recuperação de proteínas contendo KDEL do Golgi para o retículo endoplasmático (GUGLIELMELLI et al., 2014b). As mutações relacionadas ao gene são do tipo *frameshift* (inserções ou deleções), restritas ao éxon 9, em que todas levam a perda da região KDEL. As alterações mais relatadas são as mutações de tipo 1 (deleções de 52 pb, p.L367fs*46) e as mutações de tipo 2 (inserção de 5pb TTGTC, p.K385fs*47), porém as variantes dessas mutações são chamadas de “tipo 1 – *like*” e “tipo 2 – *like*”, de acordo com sua similaridade estrutural com as tipo 1 e tipo 2 respectivamente (TEFFERI et al., 2014b). A frequência dessas mutações são de cerca de 20-25% dos pacientes com TE e MFP (Tefferi e Pardanani 2014). Seu papel na patogênese das NMPC Ph-negativos ainda está sob estudo, porém alguns trabalhos mostraram que mutações no *CALR* levam a ativação independente de ligante das vias PI3K e MAPk através do TPOR (MARTY et al., 2015; NIVARTHI et al., 2016)

No tocante a frequência de pacientes com NMPC *BCR-ABL1* negativo que possuem algum desses genes mutados (*JAK2*, *CALR* ou *MPL*), de 10 a 15% ainda permanecem sem marcador molecular e são classificados como triplo-negativo (TEFFERI et al., 2014a). Apesar de terem ocorrido várias descobertas sobre as NMPC desde a última publicação dos critérios diagnósticos da OMS, em 2008, ainda não foi publicada uma nova revisão, porém as propostas para a atualização foram divulgadas e incluem mutações no *CALR* como marcador molecular e algumas mudanças nos aspectos laboratoriais (Barbui et al. 2015; Tefferi e Pardanani 2016)

Desde que a OMS normatizou os critérios de classificação e diagnóstico das NMPC em 2008 (Tefferi e Vardiman 2008), houveram muitos avanços no entendimento da neoplasia, sobretudo no que diz respeito aos marcadores moleculares para diagnóstico. Assim, uma proposta para revisão desses critérios foi estabelecida em 2015 por um dos revisores da organização (BARBUI et al., 2015). Dessa forma, o diagnóstico é feito atualmente com base em aspectos

clínicos, características laboratoriais específicas das NMPC observadas pelo hemograma, mielograma e biópsia de medula e pela detecção de marcadores genéticos (Barbui et al. 2015; Tefferi e Pardanani 2016).

Com a recente descoberta de um outro marcador de clonalidade para as NMPC (*CALR*) o principal objetivo desta revisão proposta é a inclusão deste marcador como critério diagnóstico da doença. Além disso algumas alterações em aspectos laboratoriais também foram sugeridas. Por possuir particularidades, cada entidade possui um algoritmo diagnóstico distinto. A Tabela 1 resume os principais critérios (Tefferi e Pardanani 2016) e a Figura 3 mostra o algoritmo diagnóstico para essas neoplasias.

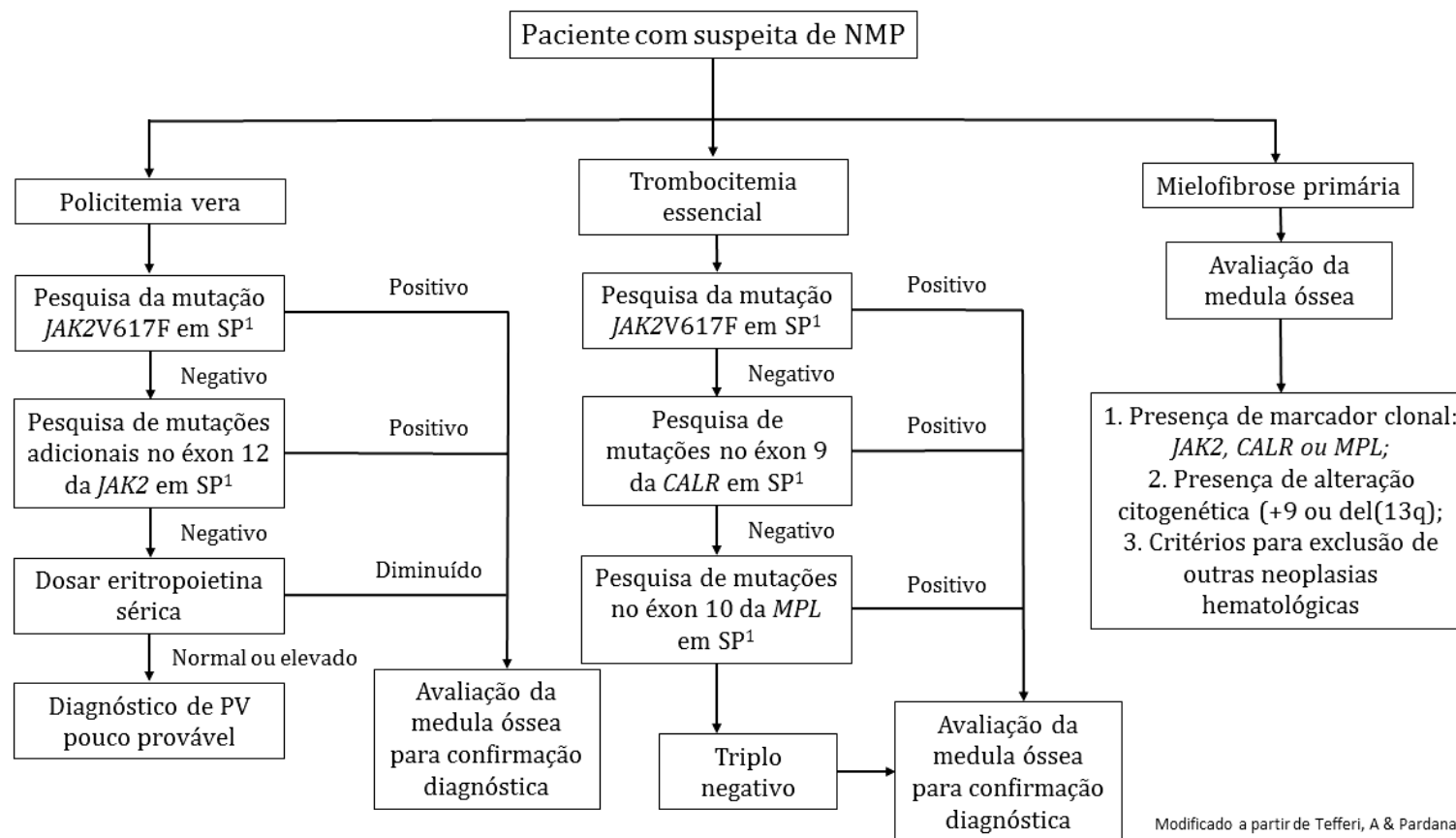
A descoberta e inclusão de novos marcadores utilizados na investigação das NMPC trouxe um avanço enorme no seu diagnóstico. Porém, ainda não se sabe quais informações a mais esses diferentes marcadores podem gerar e como utiliza-las no acompanhamento clínico do paciente. Por essa razão, estudos que visam a associação das informações genéticas com os aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes são de extrema importância.

Tabela 1: Resumo dos critérios diagnósticos empregados para cada entidade.

Entidades	Policitemia Vera (PV)	Trombocitemia Essencial (TE)	Mielofibrose Primária (MFP)
Critérios maiores	A1 – Hb >16,5 em homens e >16,0 em mulheres ou Ht >49% em homens e >48% em mulheres A2 – BMO com hipercelularidad e ajustada a idade e panmielose com megacariócitos maduros e pleomórficos A3 – Mutações em <i>JAK2</i>	A1 – contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$ A2 – BMO mostreo proliferação principalmente da linhagem megacariocítica, com aumento do número de megacariócitos maduros. Sem aumento significativo de granulopoese Neutrofílica ou eritropoese e muito raramente aumento de fibra reticulínica (grau 1) A3 – Não cumprir os critérios da OMS para outras neoplasias mieloides A4 – Presença de mutações em <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>, ou <i>MPL</i>.	A1 – BMO mostreo hiperplasia megacariocítica com atipismos, acompanhada por fibrose reticulínica ou colágena $\geq$ grau 2, acompanhada de aumento da celularidade ajustada a idade, proliferação granulocítica e frequentemente diminuição da eritropoese A2 – Não cumprir os critérios diagnósticos para outras neoplasias mieloides. A3 – Presença de mutações em <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>, ou <i>MPL</i>, ou na ausência, presença de um outro marcador de clonalidade ou não ter evidência para fibrose reticulínica reativa
Critério menor	B – Nível de eritropoietina sérica diminuídos	B – Presença de um marcador clonal ou ausência de evidência para plaquetose reativa	B – (1) Anemia; (2) Leucocitose $>11 \times 10^9/L$; (3) Esplenomegalia palpável; (4) Aumento de LDH; (5) Leucoeritroblastose
Critérios para o diagnóstico	A1-3 ou A1+2 e o critério B	A1-4 ou A1-3 e um dos critérios B	A1-3 e pelo menos um dos critérios B
*Nota: Hb: Hemoglobina; Ht: Hematócrito; BMO: Biópsia de medula óssea. Adaptado de Tefferi & Pardanani, 2016			

FONTE: Modificado de Tefferi e Pardanani, 2016.

Figura 3: Algoritmo de investigação clínica de NMP. Preconizado pela OMS e revisado recentemente por seu comitê gestor, evidencia os principais achados clínicos e organização hierárquica para investigação diagnóstica das NMP *Ph*-negativas.



Modificado a partir de Tefferi, A & Pardanani, A;
JAMA Oncology, 2016.

FONTE: Modificado de Tefferi & Pardanani, 2016.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar pacientes com NMPC Ph-negativo de acordo com marcadores moleculares diagnósticos preconizados pela OMS e correlacionar os achados com as principais características clínicas e laboratoriais de cada entidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência de mutações nos genes *JAK2* (*JAK2V617F* e éxon 12); *CALR* (mutações éxon 9) e *MPL* (mutações éxon 10);
2. Correlacionar esses achados com aspectos clínicos (sobrevida global e evolução clonal para leucemia aguda) e características laboratoriais de pacientes com NMPC Ph-negativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Este estudo é do tipo coorte com comparação entre grupos internos, realizado no laboratório do Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial, do laboratório central do Centro de Biociências (NHCL LabCen/CB/UFPE) e nas Unidades de Hematologia Clínica e Laboratórios Especializados da Fundação HEMOPE (UNILABE). Foram incluídas no estudo 260 amostras de pacientes adultos de ambos os sexos, diagnosticados com NMPC – Ph negativo. Todos esses pacientes tiveram acompanhamento no ambulatório do Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, Recife – PE.

Os critérios de inclusão estabelecidos foram a ausência de transcritos do rearranjo *BCR-ABL1* ou cromossomo Ph-positivo, cumprimento pleno do algoritmo diagnóstico para NMPC segundo critérios mais atuais recomendados pela OMS, e disponibilidade de acesso aos prontuários dos pacientes para caracterização clínica e laboratorial da doença. As variáveis analisadas ao diagnóstico foram: idade, sexo, subtipo de NMPC (com base nos critérios da OMS), dados do hemograma (níveis de hemoglobina e hematócrito, contagem de leucócitos e plaquetas) e a presença da mutação *JAK2V617F*. O material utilizado na pesquisa foi o mesmo encaminhado ao laboratório para fins diagnósticos, não sendo realizada qualquer coleta adicional.

O presente trabalho é parte de um projeto maior, que objetiva a caracterização molecular de pacientes com NMPC, e teve sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE (Nº do parecer: 013/09) (Anexo I). A Fundação de Hematologia de Pernambuco (HEMOPE), foi incluída no presente trabalho como instituição co-participante, uma vez que os pacientes foram obtidos da mesma.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

4.2.1 Extração de dna genômico

A extração do DNA genômico foi realizada seguinte a técnica de extração com base no fenol-clorofórmio (Davis et al 1986). Resumidamente, as amostras de SP ou MO foram submetidas a lise dos eritrócitos, seguido de centrifugação, o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, um precipitado de leucócitos. A este precipitado foi adicionado da solução de lise de leucócitos (TKM2, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25µL de SDS 10%. Após isso foi adicionado 180µL de NaCl 5M a solução. Em seguida, esse material foi centrifugado e o sobrenadante recuperado e transferido para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionado fenol tamponado e uma solução SEVAG, composta de 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico, seguido de homogeneização e centrifugação.

Mais uma vez o SEVAG foi misturado ao sobrenadante para última separação, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Neste novo microtubo, foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,2 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EUA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1%.

4.2.2 Identificação de marcadores de clonalidade

4.2.2.1 Pesquisa de mutações no gene jak2

A detecção da mutação JAK2 V617F foi realizada como descrito por Baxter et al (2005). Na tabela 2 estão listados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e a enzima para o estudo da mutação, assim como o tamanho dos fragmentos após amplificação e a restrição com a endonuclease.

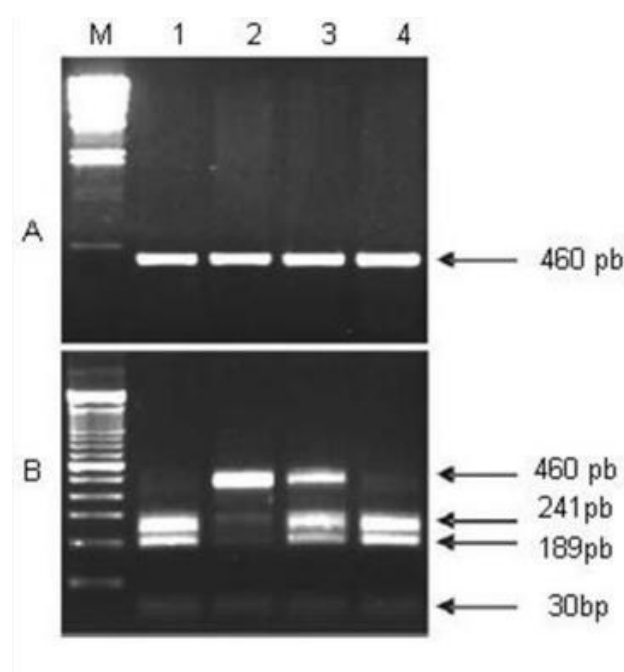
Tabela 2. Primers e enzima de restrição utilizados para a pesquisa da JAK2V617F

Sequência do <i>primer</i>	Produto do PCR	Enzima	Produto da digestão
<i>Foward:</i> GGGTTTCCTCAGAACGAACGTTGA	460 pb	BsaXI	241 pb
<i>Reverse:</i> TCATTGCTTTCCTTTTTCACAA			189 pb
			30 pb

FONTE: O Autor, 2016.

Após verificação da amplificação de fragmentos de tamanho esperado, os produtos foram submetidos à reação de digestão pela enzima de restrição *BsaXI* (New Engle, EUA). A reação foi realizada com: 5µl de produto de PCR, 1x de *CutSmart® Buffer*, e 1U de *BsaXI*, em volume final de 15µl. A reação ocorreu a 37°C *overnight*. O fragmento amplificado a partir do alelo selvagem *JAK2* é digerido em fragmentos de 241 pares de base (pb), 189pb e 30pb pela enzima, no entanto, a mutação *JAK2V617F* acarreta na perda de 2 sítios reconhecidos pela enzima, eviteo seu corte torneio o fragmento intacto (460pb). A análise de digestão foi realizada em gel de agarose 3% corado com brometo de (Figura 4).

Figura 4: Metodologia empregada para identificação da JAK2V617F **A.** Produto de PCR da JAK2 V617F contendo 460pb. **B.** Padrões de digestão da JAK2 com a enzima *BsaX* I apresento positividade no sítio não digerido permanecendo com 460pb após a digestão (alelo mutado): M: Marcador de peso molecular de 100pb; 1: Paciente com TE com alelos normais para a mutação JAK2V617F 2: Paciente com PV, homozigoto para mutação JAK2V617F 3: Paciente com MFP; mostreo um alelo normal e um alelo mutado (heterozigoto) para mutação JAK2V617F; 4: Amostra de indivíduo saudável.



FONTE: Monte-Mór et al. 2007.

Para a pesquisa das mutações no éxon 12 foi realizado sequenciamento direto dos produtos de PCR. Os primers utilizados estão na Tabela 3. O protocolo de ciclagem foi o mesmo utilizado tanto para a pesquisa da mutação V617F quanto para o éxon 12(Tabela 4). As reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando o MasterMix GoTaq® (Promega, EUA) e avaliadas em gel de agarose a 1%.

Tabela 3. Primers utilizados para pesquisa de mutações no éxon 12.

JAK2 exon 12	Foward (5'>3')	Reverse (5'>3')	Produto do PCR
	CATACTTTCAGTGTATTTTGA AGTG	ATGTCACATGAATGTAAATCAA G	259pb

FONTE: O Autor, 2016.

Tabela 4.Protocolo de ciclagem utilizados para PCR da JAK2

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação Inicial	96°C	2 minutos
35 ciclos		
Desnaturação	96°C	30 segundos
Anelamento	56°C	30 segundos
Extensão	72°C	1 minuto
Extensão Final	72°C	5 minutos

FONTE: O Autor, 2016.

Antes de submeter os produtos de PCR à reação de sequenciamento, estes foram purificados utilizando o *mix* de enzimas Exo-Sap IT® (USB Laboratories, EUA) composto por Exonuclease I e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). A química utilizada para sequenciamento foi a do kit *BigDye Cycle Sequencing*® (*Applied BioSystems*, EUA), utilizando o seguinte protocolo Tabela 5:

Tabela 5.Reagentes utilizados para a reação de sequenciamento.

Reagente	Volume (µL)
Produto de PCR purificado	5,0
Tampão de sequenciamento (5x)	2,0
<i>BigDye Premix</i> ®	0,5
Primer (5 pmol)	1,0
Água ultrapura	1,5

FONTE: O Autor, 2016.

A precipitação da placa utilizou o protocolo EDTA-acetato de sódio-etanol, em que, sumariamente, os produtos provenientes da reação de sequenciamento são precipitados utilizando 2µL de acetato de sódio 3M pH5,2, 2µL de EDTA 125mM e 50µL de etanol 100% gelado e centrifugados a 2250g por 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado com *spin* da placa invertida a 180g por 1 minuto. Os produtos foram lavados com etanol 70% gelado e centrifugados novamente a 2250g por 15 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, os produtos foram ressuspensos em *Hi-Di*® *Formamide* (*Applied BioSystems*, EUA) no momento da injeção. O sistema automático utilizado foi o 3500 XL Genetic Analyzer® (*Applied BioSystems*, EUA)

disponível pelo Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (NPT-CPqAM/FIOCRUZ). Ao menos duas sequências de cada conjunto de *primers* para cada paciente foram produzidas, obtendo deste modo as sequências referentes às fitas molde e complementar.

4.2.2.2 Pesquisa de mutações no exon 9 do gene CALR

A pesquisa das mutações no éxon 9 do gene *CALR* foi realizada por sequenciamento direto dos produtos de PCR. Os primers utilizados na pesquisa foram descritos previamente por Bilbao-Sieyro C, *et al* 2014. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando o MasterMix GoTaq® (Promega, EUA) e avaliadas em gel de agarose a 1%. O pós-PCR e a preparação da amostra para o sequenciamento seguiram os mesmos passos realizados para o éxon 12 do *JAK2*.

4.2.2.3 Pesquisa de mutações no gene MPL

A identificação da mutação *MPLW515L* e *MPLW515K* foram realizadas através do kit Taqman® Mutation Detection Assay (Life Technologies) com as seguintes sondas, Tabela 6:

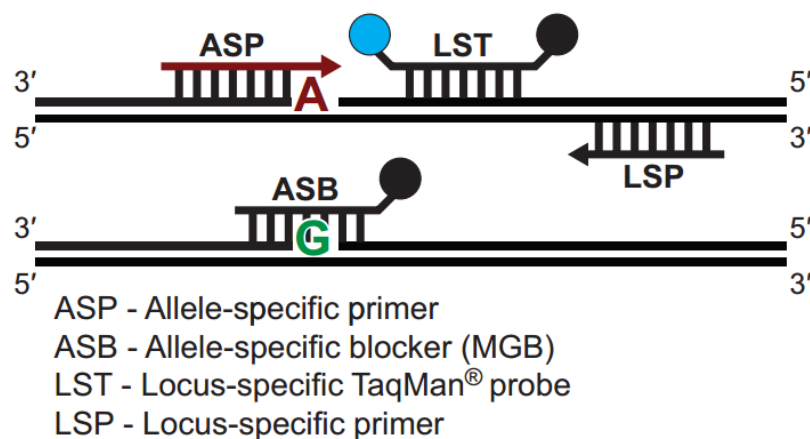
Tabela 6. Sondas do kit Taqman Mutation Detection Assay (Life Technologies).

ENSAIO	TIPO DO ENSAIO	NUCLEOTÍDEO MUTADO	MUDANÇA DE AMINOÁCIDO
MPL_18918_mu	Alelo Mutante	1544G>T	W515L
MPL_19193_mu	Alelo Mutante	1543_1544TG>AA	W515K
MPL_rf	Gene referência		

FONTE: O Autor (2016).

Cada ensaio contém um primer alelo específico, um bloqueador alelo específico, uma sonda Taqman® e um primer locus específico (Figura 5). O teste baseia-se em uma PCR-álélico-específica, porém possui uma sonda Taqman e primer bloqueadores alelo específicos, que impedem a amplificação do alelo selvagem, fazendo com que no ensaio mutado apenas o alelo de interesse amplifique.

Figura 5. Componentes do ensaio para pesquisa de mutações *W515L/K* no gene *MPL*.



FONTE: *Protocol Taqman[®] Mutation Detection Assay, ThermoFisher (2012).*

4.3 BIOINFORMÁTICA

4.3.1 Montagem e avaliação dos *contigs*

Após confirmação da qualidade das sequências estas foram comparadas com a sequência de referência (NG_029662) para *CALR* e para *JAK2* a sequência (NG_009904) referendada pelo *NCBI* (do inglês, *National Centre for Biotechnological Information*). O alinhamento das sequências (*contigs*) foram montados e avaliados utilizando o *Software CLC MainWorkBench[®] 6.9.1*.

4.3.2 Análise estatística

A análise estatística foi realizada de forma descritiva com o auxílio do software *SPSS Statistics 19.0*. Os pacientes com NMPC foram categorizados de acordo com a presença ou ausência de mutações nos genes estudados (*JAK2*, *CALR* e *MPL*). As variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste de Mann-Whitney, enquanto que para variáveis categóricas foi utilizado o teste de *Chi-quadrado* ou teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS E DESCRIÇÃO DA COORTE

Entre o período de janeiro 2008 e dezembro de 2015, 456 indivíduos com suspeita de NMPC Ph-negativo foram atendidos no serviço de Hematologia da Fundação HEMOPE. Seguindo os critérios preconizados pela OMS para diagnósticos de NMPC, a pesquisa do rearranjo BCR/ABL e da mutação *JAK2V617* foi realizada em todos os casos. Todos pacientes incluídos no estudo foram BCR/ABL negativos. Desses, 156 pacientes (34%) foram positivos para a mutação *JAK2V617*. Os demais (300 casos, 66%) foram submetidos a triagem de prontuários, levando-se em consideração achados clínicos e laboratoriais condizentes com a doença. Desta forma, 104 indivíduos com *JAK2V617F* negativo apresentaram critérios clínicos e laboratoriais para inclusão no estudo. Assim, a coorte analisada no presente trabalho foi constituída de 260 pacientes com NMPC.

5.2 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM NMPC PH-NEGATIVO

Dos 260 pacientes incluídos no estudo, 69 foram diagnosticados com PV (27%), 147 com TE (57%) e 42 com MFP (16%). Dois pacientes apresentaram marcadores de clonalidade para NMPC ao diagnóstico (*JAK2V617F* positivo), mas o laudo clínico ainda não tinha sido disponibilizado no momento das análises, logo esses pacientes foram utilizados somente nas análises descritivas de frequência. A mediana de idade da coorte foi de 59 anos (variação: 16 a 95 anos), com um percentual ligeiramente maior de mulheres (170/260, 65%). Todas as características clínicas e laboratoriais estão resumidas na Tabela 7, destacando-se os principais aspectos clínicos e laboratoriais de cada entidade. Resumidamente, os níveis de hemoglobina ($P < 0,001$) e hematócrito ($P < 0,001$) foram mais elevados em pacientes PV, enquanto que a contagem de plaquetas e leucócitos foram mais elevadas em pacientes TE ($P < 0,001$) e MFP ($P < 0,001$), respectivamente (Tabela 7). É importante destacar que esses achados

clínicos podem se sobrepor entre as diferentes entidades, porém algumas características se destacam, como uma maior frequência de esplenomegalia ($P < 0,001$) e necessidade transfusional nos pacientes com MFP e uma maior frequência de sintomas constitucionais (cefaleia, prurido, fraqueza, sudorese e tontura) em pacientes com PV (Tabela 7).

Tabela 7.Resumo dos dados clínicos e laboratoriais das pacientes incluídos no estudo.

Características	Todos pacientes (n = 260)		Policitemia Vera (n = 69)		Trombocitemia essencial (n = 147)		Mielofibrose primária (n = 42)		P-valor
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
Sexo									0,018
Mulher	170	65,4	39	56,5	107	72,8	23	54,8	
Homem	90	34,6	30	43,5	40	27,2	19	45,2	
Esplenomegalia									<0,001
Não	187	71,9	41	59,4	130	88,4	14	33,3	
Sim	73	28,1	28	40,6	17	11,6	28	66,7	
Necessidade transfusional									<0,001
Não	228	87,7	65	94,2	136	92,5	25	59,5	
Sim	32	12,3	4	5,8	11	7,5	17	40,5	
Sangria									<0,001
Não	200	76,9	15	21,7	144	98	39	92,9	
Sim	60	23,1	54	78,3	3	2	3	7,1	
Trombose									0,565
Não	238	91,5	61	88,4	136	92,5	39	92,9	
Sim	22	8,3	8	11,6	11	7,5	3	7,1	
Hemorragia									0,154
Não	225	86,5	55	79,7	130	88,4	38	90,5	
Sim	35	13,5	14	20,3	17	11,6	4	9,5	
Sintomas Constitucionais									<0,001
Não	149	57,3	24	34,8	101	68,7	24	57,1	
Sim	111	42,7	45	65,2	46	31,3	18	42,9	
Idade (anos), mediana	58,8		63,3		54,7		58,7		0,007
Intervalo	15,8 – 95,10		21,6 – 86,1		15,8 – 86,6		25,4 – 95,1		
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	11,2		12,1		9,9		21,25		<0,001
Intervalo	2,1 – 83,6		4,2 – 24,6		2,1 – 56,2		2,6 – 83,6		
Hemoglobina (g/dL), mediana	13,9		19,8		13,2		11,4		<0,001
Intervalo	5,2 – 26,7		13,5 – 26,7		5,2 – 19,9		5,3 – 19,9		
Hematócrito (%), mediana	43,1		61,5		40,5		36,2		<0,001
Intervalo	16,9 – 79		44,1 – 79		17,8 – 60,7		16,9 – 66,2		
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	732,5		526,0		920,0		506,0		<0,001
Intervalo	26,0 – 3262		132 – 1440		114,3 – 3262		26,0 – 2125		
LDH (U/L), mediana	495		584,5		395,5		716,0		<0,001
Intervalo	163,0 – 3690		222,0 – 1262		163 - 1358		252 - 3690		

FONTE: O Autor (2016).

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PACIENTES COM NMPC PH-NEGATIVO

Seguindo as recomendações preconizadas pela OMS, todos os pacientes incluídos no estudo foram primeiramente submetidos à pesquisa de mutações no gene *JAK2*. Pacientes sem mutação neste gene foram encaminhados para pesquisa de mutações no gene *CALR* (95 pacientes, 36%). A pesquisa de mutações no gene *CALR* foi realizada em 88/95 pacientes (93%). Posteriormente a pesquisa de mutações no gene *CALR*, os pacientes duplo-negativos (*JAK2* selvagem/*CALR* selvagem) foram submetidos a pesquisa de mutações no éxon 10 do gene *MPL*. É importante salientar que as mutações acima citadas são mutuamente exclusivas, motivo pelo qual a pesquisa de mutações nesses marcadores de clonalidade devem seguir, obrigatoriamente, a seguinte: *JAK2V617* → *CALR* → *MPL*.

A pesquisa da mutação *JAK2V617F* foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP. Como dito anteriormente, 156 pacientes (60%) apresentaram a mutação *JAK2V617F*, sendo mais frequente em pacientes com PV (60/69; 87%), seguido por pacientes com MFP (28/42; 66%) e pacientes com TE (66/147; 45%). Seguindo os critérios diagnósticos da OMS, todos pacientes com suspeita clínica de PV negativos para a mutação *JAK2V617F* foram submetidos a pesquisa de mutações adicionais no éxon 12 do mesmo gene. Dos 9 pacientes (13%) com suspeita clínica de PV e negativos para a mutação *JAK2V617F*, 2 apresentaram mutações no éxon 12: 1 paciente com deleção de 6pb (c.1611_1616delTCACAA) e 1 pacientes com mutação complexa, ou seja, apresenta uma deleção de 4pb com subsequente inserção de uma timina entre o nucleotídeo 1613 e 1616 (c.1613_1616ACAA>T). Com a complementação dos resultados do sequenciamento, 62/69 pacientes (90%) dos pacientes com suspeita clínica de PV apresentaram mutação no gene *JAK2*. Esses resultados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8. Frequências de mutações no gene JAK2 (JAK2V617F e mutações adicionais no éxon 12).

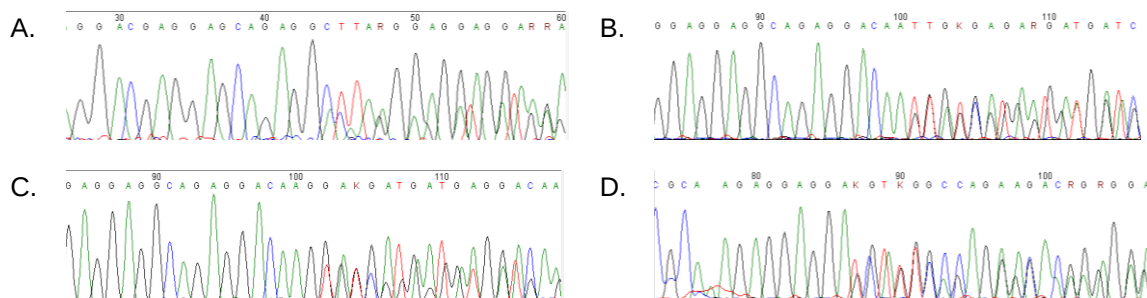
	Todos os pacientes (n=260)		Policitemia Vera (n=69)		Trombocitemia essencial (n=147)		Mielofibrose primária (n=42)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<i>JAK2V617F</i>								
Mutado	156	60	60	87	66	44,9	28	64,1
Não mutado	104	40	9	13	81	55,1	14	35,9
JAK2 éxon 12								
Mutado	2	0,7	2	2,9	-	-	-	-
Não mutado	258	99,3	67	97,1	-	-	-	-

FONTE: O Autor (2016).

Seguindo algoritmo padrão para critérios diagnósticos de pacientes com suspeita clínica NMPC (Figura 3), 95 pacientes sem mutação no gene *JAK2* foram submetidos a pesquisa de mutações no éxon 9 do gene *CALR*. Desses, 89/95 pacientes (93%) dos pacientes com suspeita clínica de TE e MFP foram analisados para essas mutações. Os 6 pacientes restantes apresentaram um material genético (DNA) de má qualidade, o que impossibilitou as análises.

Dos 89 pacientes analisados, 37/89 (41%) apresentaram mutações no gene *CALR*. Queo a frequência dessas mutações foi analisada por entidade (TE e MFP), 29/75 (38%) pacientes com TE apresentaram mutação no gene *CALR* (43% tipo 1 e 57% tipo2), enquanto que 8/14 (57%) pacientes com MFP apresentaram mutações no gene *CALR* (50% tipo 1 e 50% tipo2). De maneira geral, as mutações encontradas no gene *CALR* foram todas do tipo inserção (20 casos 54%) ou deleção (17 casos, 46%), previamente relatadas na literatura. Nas mutações do tipo inserção, foram encontradas 2 mutações tipo 2 *like*, sendo uma inserção de 2pb (c.1139_1140insTC) e uma de 5pb (c.1155_1156insTGTCG). As deleções encontradas foram todas mutações do tipo 1 (deleção de 52pb) (Figura 6).

Figura 6. Esquema representativo do sequenciamento do gene *CALR*. **A)** Mutação de tipo 1, deleção de 52pb (c.1092_1143del52) **B)** Mutação de tipo 2, inserção de 5pb (c.1154_1155insTTGTC) **C)** Mutação tipo 2 *like*, inserção 5pb (c.1155_1156insTGTCG). **D)** Mutação tipo 2 *like*, inserção 2pb (c.1139_1140insTC).



FONTE: O Autor (2016).

A pesquisa da mutação W515L/K foi realizada em todos os pacientes com suspeita de TE e MFP negativos para as mutações *JAK2V617F* e *CALR* (48 pacientes). Destes, 16/48 (33%), foram positivos para uma das mutações pesquisadas. Analiseo em separado, dos pacientes com TE negativos para as mutações em *JAK2* e *CALR*, 14/42 apresentaram mutações do tipo W515L/K no gene *MPL* e em MFP 3/6 pacientes. Após a caracterização quanto aos marcadores de clonalidade, foram identificados 28/147 pacientes com TE triplo-negativos e 3/42 pacientes com MFP.

5.3.1 Associação dos achados moleculares com características clínicas e laboratoriais

As análises subsequentes foram realizadas levando-se em consideração todos os pacientes incluídos no estudo que tiveram resultados moleculares analisados e diagnóstico concluído. Os pacientes com diagnóstico de PV foram utilizados apenas para uma análise de frequência, uma vez que a mutação *JAK2V617F* encontra-se presente em 90% dos pacientes e mutações no gene *CALR* não se aplica para esses pacientes. A Tabela 9 resume os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com PV, de acordo com o perfil mutacional do gene *JAK2*.

Tabela 9. Achados clínicos e laboratoriais de pacientes com PV de acordo com as mutações no gene JAK2.

Características	Policitemia Vera (n = 69)					
	JAK2V617F positivo (n = 60)		Mutações adicionais no éxon 12 (n = 2)		JAK2 selvagem ¹ (n = 7)	
	No.	%	No.	%	No.	%
Sexo						
Mulher	35	58,3	1	50	3	42,9
Homem	25	41,7	1	50	4	57,1
Esplenomegalia						
Não	34	56,7	2	100	5	71,4
Sim	26	43,3	-	-	2	28,6
Necessidade Transfusional						
Não	56	93,3	2	100	7	100
Sim	4	6,7	-	-	-	-
Sangria						
Não	13	21,7	2	100	-	-
Sim	47	78,3	-	-	7	100
Trombose						
Não	54	90	2	100	5	71,4
Sim	6	10	-	-	2	28,6
Hemorragia						
Não	48	80	2	100	5	71,4
Sim	12	20	-	-	2	28,6
Sintomas Constitucionais						
Não	22	36,7	-	-	2	28,6
Sim	38	63,3	2	100	5	71,4
Idade (anos), mediana	64,1		59,6		38,9	
Intervalo	25,5 – 86,1		59,6 – 59,6		21,6 – 68,7	
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	12,9		12,9		7,7	
Intervalo	4,2 – 24,6		8,6 – 17,2		4,2 – 11,9	
Hemoglobina (g/dL), mediana	19,85		19,5		21,4	
Intervalo	13,5 – 22,9		19,5 – 19,6		17 – 26,7	
Hematócrito (%), mediana	61,45		60,4		64,7	
Intervalo	44,1 – 72,3		58,8 – 62		49,5 – 79	
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	550,8		544,5		180	
Intervalo	180 – 1440		397 – 692		132 – 235	
LDH (U/L), mediana	621,5		-		345,5	
Intervalo	320 – 1262				222 – 758	

1: Para pacientes com PV sem mutações no gene JAK2, outros marcadores de clonalidade são pesquisados. Porém, estes não foram objeto de estudo do presente projeto.

FONTE: O Autor (2016).

A Tabela 10 e 11 estão os resultados para pacientes com TE e MFP, estratificados de acordo com o perfil de mutação nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*. Na análise univariada dos pacientes com TE, os que tinham *CALR* mutado tiveram menor contagem de leucócitos ($P = 0,016$) e maior número de plaquetas ($P = 0,002$) em relação aos que tinha a mutação *JAK2V617F*. Apesar de não obtido valor significativo de p , os pacientes com *CALR* e *MPL* mutados apresentaram uma contagem menor de leucócitos que os com mutação em *JAK2* e os triplo-negativos. Em relação aos dados clínicos, os pacientes com *CALR* tiveram uma menor frequência de sintomas constitucionais em relação aos outros grupos e coletivamente com os pacientes com *MPL* mutado parecem ter menor probabilidade de hemorragia queo comparado aos triplo-negativos, apesar de não ter alcançado significância estatística.

Tabela 10. Resumo dos resultados de associação molecular para pacientes com TE.

Trombocitemia essencial (n=147)												P – valor		
Características	JAK2V617F (n = 66)		CALR (n = 29)		MPLW515L/K (n = 14)		Triplo-negativo (n=28)		(A)vs(B)	(A)vs(D)	(B+C)vs (D)			
	(A)		(B)		(C)		(D)							
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%						
Sexo									0,473	0,312	0,278			
Mulher	47	71,2	18	62,1	12	85,7	23	82,1						
Homem	19	28,8	11	37,9	2	14,3	5	17,9						
Esplenomegalia									0,540	0,332	>0,9			
Não	55	83,3	26	89,7	13	92,9	26	92,9						
Sim	11	16,7	3	10,3	1	7,1	2	7,1						
Necessidade transfusional									0,268	-	-			
Não	58	87,9	28	96,6	12	85,7	28	100						
Sim	8	12,1	1	3,4	2	14,3	-	-						
Sangria									-	-	-			
Não	64	97	29	100	14	100	27	96,4						
Sim	2	3	-	-	-	-	1	3,6						
Trombose									0,717	>0,9	0,376			
Não	59	89,4	27	93,1	14	100	25	89,3						
Sim	7	10,6	2	6,9	-	-	3	10,7						
Hemorragia									0,274	0,752	0,104			
Não	58	87,9	28	96,6	13	92,9	23	82,1						
Sim	8	12,1	1	3,4	1	7,1	5	17,9						
Sintomas constitucionais									0,094	0,815	0,187			
Não	43	65,2	24	82,8	9	64,3	17	60,7						
Sim	23	34,8	5	17,2	5	35,7	11	39,3						
Idade (anos), mediana	59		54,7		50,9		51,7		0,411	0,225	>0,9			
Intervalo	23 – 85,7		22,9 – 86,6		15,8 – 81,5		18,7 – 80,3							
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	10,7		8,2		8,65		10,3		0,016	0,367	0,151			
Intervalo	2,1 – 48,1		5,9 – 14,6		5,6 – 13,3		4 – 25,1							
Hemoglobina (g/dL), mediana	13,5		13		12,75		13,1		0,651	0,582	0,787			
Intervalo	5,2 – 17,3		9,8 – 16,1		5,8 – 16,1		7,3 – 16,9							
Hematócrito (%), mediana	41,1		39,4		39,4		39,8		0,515	0,461	0,621			
Intervalo	17,8 – 56		31 – 48,4		19,9 – 52		24,7 – 53,1							
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	815		1106,5		896		948,5		0,002	0,263	0,169			
Intervalo	455 – 2291		510 - 1956		594 – 2245		465 – 1880							
LDH (U/L), mediana	468		458		245		408,5		0,810	0,690	0,189			
Intervalo	163 - 1166		220 - 1358		179 - 684		211 – 754							

FONTE: O Autor (2016).

Nos pacientes com MFP que tiveram *JAK2* mutado observou-se maior contagem de leucócitos ($P = 0,01$; vs *CALR*), ($p = 0,019$; vs triplo-negativo) comparado aos outros grupos e menores níveis de LDH ($P = 0,045$) em relação aos *CALR* mutado. Os níveis de hemoglobina dos pacientes com mutação em *JAK2* confrontados com os pacientes mutados para *CALR* e com os triplo-negativos parecem ser maiores ainda que não tenham valor estatístico significativo. Clinicamente os pacientes com *CALR* tendem a ser mais jovens comparados aos *JAK2V617F* e mais frequentemente do sexo masculino.

Tabela 11. Resumo dos resultados de associação molecular para pacientes com MFP

Características	Mielofibrose primária (n=42)								P – valor		
	JAK2V617F (n = 28)		CALR (n = 8)		MPL W515L/K (n = 3)		Triplo-negativo (n=3)		(A)vs(B)	(A)vs(D)	(B+C)vs(D)
	(A)		(B)		(C)		(D)				
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%			
Sexo									0,422	0,558	>0,9
Mulher	17	60,7	3	37,5	2	66,7	2	66,7			
Homem	11	39,3	5	62,5	1	33,3	1	33,3			
Esplenomegalia									0,384	-	0,192
Não	2	7,1	2	25	1	33,3	3	100			
Sim	26	92,9	6	75	2	66,7	-	-			
Necessidade transfusional									0,217	0,281	>0,9
Não	19	67,9	3	37,5	2	66,7	1	-			
Sim	9	32,1	5	62,5	1	33,3	2	100			
Sangria									-	-	-
Não	25	89,3	8	100	3	100	3	100			
Sim	3	10,7	-	-	-	-	-	-			
Trombose									-	-	-
Não	26	92,9	8	100	2	66,7	3	100			
Sim	2	7,1	-	-	1	33,3	-	-			
Hemorragia									-	0,271	0,396
Não	26	92,9	8	100	2	66,7	2	66,7			
Sim	2	7,1	-	-	1	33,3	1	33,3			
Sintomas Constitucionais									>0,9	0,558	>0,9
Não	17	60,7	5	62,5	1	33,3	-	-			
Sim	11	39,3	3	37,5	2	66,7	3	100			
Idade (anos), mediana	65,7		58		25,4		48,2		0,432	0,178	0,584
Intervalo	40,2 – 95,1		46,7 – 74,9		25,4 – 54,1		25,4 – 69,3				
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	25,05		9,55		7,6		10,3		0,01	0,019	0,697
Intervalo	3,7 – 83,6		2,6 – 40,9		3,8 – 15,8		3,9 – 16,1				
Hemoglobina (g/dL), mediana	11,65		9,45		12,6		8,2		0,183	0,057	0,243
Intervalo	7,2 – 19,9		6,7 – 13,1		5,3 – 15,8		6,5 – 10,3				
Hematócrito (%), mediana	38,65		31,85		38,6		27,2		0,083	0,053	0,139
Intervalo	23,1 – 66,2		23,6 – 38,5		16,9 – 49		22,9 – 31,5				
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	517		379,5		1102		92		0,255	0,226	0,312
Intervalo	35 – 2125		104 – 1132		26 – 1501		91 – 1063				
LDH (U/L), mediana	646,5		1304		576		492		0,045	0,378	0,157
Intervalo	312 - 3690		742 - 1777		576 – 716		252 – 732				

FONTE: O Autor (2016).

6 DISCUSSÃO

A análise molecular das mutações clonais associadas as NMPC Ph-negativo é o principal destaque na revisão de 2016 da OMS, principalmente após a descoberta e inclusão de mutações no gene *CALR* aos critérios diagnósticos desta patologia (ARBER et al., 2016). Além da extrema importância de marcadores moleculares para o diagnóstico de NMPC, torna-se cada vez mais evidente o esforço para identificação do valor prognóstico desses marcadores sobre os principais desfechos que acometem estes pacientes (Tefferi 2014; Cerquozzi e Tefferi 2015). A estruturação de um sistema de determinação prognóstica baseado nas alterações moleculares é investigado em diversos estudos, e promoverá, por fim, o estabelecimento de novas condutas clínicas e terapias risco ajustadas (Rumi et al. 2014; Verger et al. 2015; Guglielmelli et al. 2016).

Com a evidência da relevância diagnóstica e prognóstica desses marcadores moleculares de clonalidade e as variações demográficas acerca de suas incidências (GRINSZTEJN et al., 2016; JEROMIN et al., 2016; LABASTIDAMERCADO et al., 2015; MEHROTRA et al., 2015; TEFFERI et al., 2014d), realizamos uma análise retrospectiva de pacientes atendidos no estado de Pernambuco (outubro/2008 a março/2016) afim de caracterizá-los quanto ao *status* mutacional dos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*, associeo esses achados com variáveis laboratoriais e clínicas. É importante ressaltar que nosso trabalho é pioneiro no nordeste brasileiro e um dos poucos no Brasil com essa proposta (MONTE-MOR et al., 2016; NUNES et al., 2015). Além disso, nosso estudo possibilitou a introdução da pesquisa de mutações no gene *CALR* no nosso estado, permitindo sua adição à rotina molecular dos pacientes em investigação clínica de NMPC Ph-negativo.

Nossos resultados mostraram que a composição da coorte avaliada se assemelha consideravelmente com outras descritas na literatura no que se refere as principais entidades, respeiteo a proporção estimada para cada entidade segundo dados epidemiológicos (Tefferi et al. 2014a; Labastida-Mercado et al. 2015; Nunes et al. 2015; Grinsztejn et al. 2016; Monte-Mor et al. 2016; Tefferi e Vardiman 2008; Wadleigh e Tefferi 2010; Srour et al. 2016). Em

relação a caracterização molecular, foi possível determinar a frequência dos marcadores diagnósticos estabelecidos pela OMS, cujas frequências estão de acordo com dados publicados (GRINSZTEJN et al., 2016; LABASTIDAMERCADO et al., 2015; MONTE-MOR et al., 2016; TEFFERI et al., 2014d). Evidenciamos, desta maneira, a importância da identificação de mutações no gene *JAK2* para os pacientes com PV, visto que a maioria deles (90%, 62/69) apresenta mutações envolvendo este gene (BARBUI et al., 2014; HARRISON, 2010; TEFFERI, 2013).

Observamos uma inversão da frequência de distribuição dos tipos de mutações no gene *CALR* (tipo 1 e tipo 2) em nossos pacientes queo comparados à coortes de países como Estados Unidos, Inglaterra e Itália (KLAMPFL et al., 2013; NANGALIA et al., 2013; TEFFERI et al., 2014c), porém nossos dados são semelhantes ao de uma coorte de outro grupo brasileiro (MONTE-MOR et al., 2016), sugerindo que os mecanismos fisiopatológicos possam ser diferentes nas coortes avaliadas.

Já foi relatado que pacientes com TE mutados para *CALR* cursam com maior contagem de plaquetas, menores níveis de hemoglobina e menor número de leucócitos (MONTE-MOR et al., 2016; RUMI et al., 2014b; TEER; PAINTER; MACIEJEWSKI, 2015). Em pacientes com MFP mutados para *CALR*, a contagem de leucócitos é significativamente menor, juntamente com maiores níveis de hemoglobina, menor mediana de idade e maiores contagens de plaquetas (RUMI et al., 2014b; TEFFERI et al., 2014d; VAINCHENKER et al., 2016). Também foram descritas menor sobrevida para os pacientes triplo-negativo (*JAK2*, *CALR* e *MPL* selvagens) e *JAK2* mutado e maior risco de desenvolver eventos trombóticos para pacientes com TE que possuem a mutação *JAK2V617F* (TEFFERI et al., 2014a; TEFFERI; NOEL; HANSON, 2011; TEFFERI, 2015b; VAINCHENKER et al., 2016). Em nosso trabalho, pacientes mutados para *JAK2* apresentaram maior número de leucócitos e maior frequência de esplenomegalia queo comparado aos *CALR* mutados, que, em contrapartida, apresentam plaquetose mais evidente e menores níveis de hemoglobina em pacientes com MFP (Nunes et al. 2015, Monte-Mor et al. 2016). Ademais, pacientes com TE que apresentaram mutações no gene *CALR* tiveram uma maior contagem de plaquetas e menor número de leucócitos queo comparado com pacientes com a mutação *JAK2V617F*, este dado está de

acordo com dados publicados previamente (Erikovics et al. 2014; Kim et al. 2015; Grinsztejn et al. 2016; Monte-Mor et al. 2016).

Recentemente, foram publicados ensaios funcionais de mutações no gene *CALR* sugerindo um modelo fisiopatológico para o gene nas NMPCs. Esses trabalhos demonstram que as alterações em *CALR* dependem exclusivamente do receptor de trombopoietina, diferente da *JAK2V617F* que atua também em outros receptores mieloides, tais como os de eritropoietina e GM-CSF, aumente o seletivamente o número de megacariócitos, e torne sua produção independente de citocinas (ELF et al., 2016; MARTY et al., 2015). Esses resultados justificam os achados dos estudos descritivos que mostram pacientes com TE *CALR* mutado com maiores níveis de plaqueta.

Na análise univariada dos pacientes com MFP, foi observado maior número de leucócitos nos pacientes com *JAK2* mutado, e, apesar de não ser estatisticamente diferente, possuem maior mediana de idade ao diagnóstico, esses resultados estão de acordo com outros relatos (Tefferi et al. 2014a; Guglielmelli et al. 2014b; Bose e Verstovsek 2016). Ademais, em nossa coorte foi possível observar que pacientes com *CALR* mutado tendem a possuir menores níveis de hemoglobina e plaqueta e mostram valores de LDH maiores, frente aos *JAK2* mutados ($P = 0,045$), embora os dados de plaqueta sejam conflituosos com os de outros grupos (GRINSZTEJN et al., 2016; KIM et al., 2015; TEFFERI et al., 2014d) essa diferença pode ser devido ao baixo número de amostras com esta alteração.

No que se refere aos triplo-negativos para MFP, foi relatado que estes pacientes possuem mediana de sobrevida menor em comparação aos grupos com algum marcador de clonalidade (Milosevic e Kralovics 2013; Vannucchi et al. 2013; Tefferi 2015b). Contudo, em nosso estudo não foi possível realizar esta análise devido à restrição do número amostral. Quanto a análise de evolução clonal para leucemia aguda, tendo em vista que a probabilidade deste evento, em 10 anos, para as entidades gira em torno de 1% para TE, 4% para PV e 10% para MFP (Passamonti 2012; Cleary e Kralovics 2013; Pontus Lundberg e Axel Karow 2014) e que a mediana de seguimento de nossa coorte é de 5 anos, podemos concluir que nossa coorte ainda é muito jovem, impossibilitando, no momento, uma possível análise de evolução clonal.

Apesar das dificuldades encontradas (principalmente dificuldades burocráticas para obtenção de prontuários e de informações de exames complementares para o diagnóstico desta patologia), o presente trabalho descreve de forma robusta a caracterização molecular de pacientes com NMPC diagnosticados e acompanhados em nosso estado. Além disso, nossos resultados constituem uma importante ferramenta laboratorial para o corpo clínico local, por mostrar as características dos pacientes em nossa região, podendo assim auxiliar na conduta mais apropriada para esses pacientes, além de fornecer informações de uma coorte do Brasil para complementar o conhecimento sobre os pacientes com NMPC Ph-negativo.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no estudo é possível concluir que:

- A frequência dos marcadores clonais diagnósticos preconizados pela OMS são semelhantes àquelas expostas em outros trabalhos;
- Parte das características clínicas e laboratoriais avaliadas para cada entidade encontra-se associada com a presença dos marcadores clonais, evidenciando as diferenças fenotípicas provocadas por cada um dos marcadores diagnósticos.

REFERÊNCIAS

- AL-LAZIKANI, B.; SHEINERMAN, F. B.; HONIG, B. Combining multiple structure and sequence alignments to improve sequence detection and alignment: application to the SH2 domains of Janus kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 14796–14801, 2001.
- ANDRIKOVICS, H. et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. **Haematologica**, v. 99, n. 7, p. 1184–1190, 2014.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. blood-2016-03-643544, 2016.
- BARBUI, T. et al. Rethinking the diagnostic criteria of polycythemia vera. **Leukemia**, v. 28, n. 6, p. 1191–1195, 2013.
- BARBUI, T. et al. Rethinking the diagnostic criteria of polycythemia vera. n. November 2013, p. 1–5, 2014.
- BARBUI, T. et al. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. **Blood Cancer Journal**, v. 5, n. 8, p. e337-8, 2015.
- BARBUI, T.; FINAZZI, G.; FALANGA, A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. **Blood**, v. 122, n. 13, p. 2176–2184, 2013.
- BAXTER, E. J. et al. Mechanisms of Disease Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, p. 1054–1061, 2005.
- BOSE, P.; VERSTOVSEK, S. The Evolution and Clinical Relevance of Prognostic Classification Systems in Myelofibrosis. p. 681–692, 2016.
- CERQUOZZI, S.; TEFFERI, A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. **Blood Cancer J**, v. 5, n. 11, p. e366, 2015.
- CHALLIER, C. et al. The cytoplasmic domain of Mpl receptor transduces exclusive signals in embryonic and fetal hematopoietic cells. **Blood**, v. 100, n. 6, p. 2063–70, 2002.
- CLEARY, C.; KRALOVICS, R. 11.25_R2_Molecular basis and clonal evolution of myeloproliferative neoplasms. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 51, n. 10, p. 1889–96, 2013.
- DRUKER, B. J. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the Bcr-Abl Tyrosine. **English Journal**, v. 344, n. 14, p. 1031–1037, 2001.
- ELF, S. et al. Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. **Cancer Discovery**, 2016.
- ENBLOM, A. et al. High rate of abnormal blood values and vascular complications before diagnosis of myeloproliferative neoplasms. **European Journal of Internal Medicine**, 2015.
- FINAZZI, G.; DE STEFANO, V.; BARBUI, T. Are MPNs vascular diseases? **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 8, n. 4, p. 307–316, 2013.
- GANGAT, N. et al. DIPSS plus: A refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 4, p. 392–397, 2011.
- GEYER, H. L. et al. Distinct clustering of symptomatic burden among myeloproliferative neoplasm patients: Retrospective assessment in 1470 patients. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3803–3810, 2014.

- GOLD, L. I. et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. **Faseb J**, v. 24, n. 3, p. 665–683, 2010.
- GRINSZTEJN, E. et al. The prevalence of *CALR* mutations in a cohort of patients with myeloproliferative neoplasms. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 102–106, 2016.
- GRISOUARD, J. et al. Deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhances thrombocytosis and shortens survival in a JAK2-V617F mouse model of MPN. **Blood**, 2015.
- GUGLIELMELLI, P. et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. **Leukemia**, n. February, p. 1–7, 2014a.
- GUGLIELMELLI, P. et al. Calreticulin: a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms. **Expert review of hematology**, v. 7, n. 4, p. 423–5, 2014b.
- HARRISON, C. Rethinking disease definitions and therapeutic strategies in essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2010, p. 129–134, 2010.
- HARRISON, C. N. et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis. **British Journal of Haematology**, v. 149, n. 3, p. 352–375, 2010.
- JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1144–1148, 2005.
- JEROMIN, S. et al. Next-generation deep-sequencing detects multiple clones of *CALR* mutations in patients with BCR-ABL1 negative MPN. **Leukemia**, v. 30, n. 4, p. 973–6, 2016.
- KIM, B. H. et al. JAK2 V617F, MPL, and *CALR* mutations in Korean patients with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, n. 7, p. 882–888, 2015.
- KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 25, p. 2379–90, 2013.
- KRALOVICS, R. et al. A Gain-of-Function Mutation of Mutation of JAK2 in Myeloproliferatives Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, p. 1779–1790, 2005.
- KVASNICKA, H. M. WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 8, n. 4, p. 333–341, 2013.
- LABASTIDA-MERCADO, N. et al. The mutation profile of JAK2, MPL and *CALR* in Mexican patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, n. xx, p. 1–6, 2015.
- LEKOVIC, D. et al. Predictors of survival and cause of death in patients with essential thrombocythemia. **European Journal of Haematology**, p. n/a-n/a, 2015.
- 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. 387–397, 2005.
- MARTY, C. et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. **Blood**, v. 127, n. 10, p. 1317–1325, 2015.
- MCGAFFIN, G. et al. JAK2 V617F and *CALR* mutations are not mutually exclusive; findings from retrospective analysis of a small patient cohort. **British Journal of Haematology**, v. 167, n. 2, p. 276–278, 2014.
- MEHROTRA, M. et al. Clinical validation of a multipurpose assay for detection and genotyping of *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 144, n. 5, p. 746–755, 2015.

- MILOSEVIC, J. D.; KRALOVICS, R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. **International Journal of Hematology**, v. 97, n. 2, p. 183–197, 2013.
- MONTE-MOR, B. DA C. R. et al. Clinical features of JAK2V617F- or CALR-mutated essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, p. 3–6, 2016.
- MURUGESAN, G. et al. Validation of a molecular diagnostic assay for *CALR* exon 9 indels in myeloproliferative neoplasms: identification of coexisting *JAK2* and *CALR* mutations and a novel 9 bp deletion in *CALR*. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 3, p. 284–297, 2016.
- NANGALIA, J. et al. Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2*. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2391–2405, 2013.
- NEMER, W. EL; GRANDIS, M. DE; BRUSSON, M. Abnormal adhesion of red blood cells in polycythemia vera: A prothrombotic effect? **Thrombosis Research**, v. 133, n. SUPPL. 2, p. 107–111, 2014.
- NIVARTHI, H. et al. Thrombopoietin receptor is required for the oncogenic function of *CALR* mutants. **Leukemia**, n. February, p. 1–4, 2016.
- NUNES, D. P. T. et al. *CALR* mutations screening in wild type *JAK2*^{V617F} and *MPL*^{W515K/L} Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 55, n. 3, p. 236–240, 2015.
- PARDANANI, A. et al. Safety and efficacy of CYT387, a *JAK1* and *JAK2* inhibitor, in myelofibrosis. **Leukemia**, v. 27, n. 6, p. 1322–1327, 2013.
- PARDANANI, A. D. et al. *MPL*⁵¹⁵ mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3472–3476, 2006.
- PASSAMONTI, F. Classification of Myeloproliferative Neoplasms and Prognostic Factors. **ASCO University: Educational Series**, p. 419–424, 2012.
- PASSAMONTI, F.; MORA, B.; MAFFIOLI, M. New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms. **Current Opinion in Hematology**, v. 23, n. 2, p. 137–143, 2016.
- PECQUET, C. et al. Thrombopoietin receptor down-modulation by *JAK2* V617F: Restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic *JAK2* signaling and of proteasomes. **Blood**, v. 119, n. 20, p. 4625–4635, 2012.
- PIKMAN, Y. et al. *MPL*^{W515L} is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1140–1151, 2006.
- PONTUS LUNDBERG; AXEL KAROW. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 123, n. 14, p. 2220–2228, 2014.
- QUINTÁS-CARDAMA, A.; VERSTOVSEK, S. Molecular pathways: *JAK/STAT* pathway: Mutations, inhibitors, and resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 8, p. 1933–1940, 2013.
- RUMI, E. et al. *JAK2* or *CALR* mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. **Blood**, v. 123, n. 10, p. 1544–1551, 2014a.
- RUMI, E. et al. Clinical effect of driver mutations of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* in primary myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 7, p. 1062–1069, 2014b.
- Ruxolitinib is an effective treatment for *CALR* -positive patients with myelofibrosis. p. 938–940, 2016.
- SAVONA, M. R. et al. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. **Blood**, v. 125, n. 12, p. 1857–1865, 2015.

SCOTT, L. M. et al. Mechanisms of Disease Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, p. 1054–1061, 2005.

SCOTT, L. M. et al. Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 14, p. 1457–1457, 2007a.

SCOTT, L. M. et al. Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. **The New England journal of medicine**, v. 356, n. 5, p. 459–468, 2007b.

SCOTT, L. M. The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. **American Journal of Hematology**, v. 86, n. 8, p. 668–676, 2011.

SROUR, S. A. et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001–12. **British Journal of Haematology**, p. 1–15, 2016.

STAERK, J. et al. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. **Blood**, v. 107, n. 5, p. 1864–1871, 2006.

TEER, J. K.; PAINTER, J. S.; MACIEJEWSKI, J. P. To the editor : CALR mutations in patients with essential thrombocythemia diagnosed in childhood. v. 123, n. 23, p. 3677–3680, 2015.

TEFFERI, A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 6, p. 508–516, 2013.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 1, p. 97–108, 2014.

TEFFERI, A. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 16, p. 2507–2513, 2014a.

TEFFERI, A. et al. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 28, n. 7, p. 1407–13, 2014b.

TEFFERI, A. et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 8, p. 121–124, 2014c.

TEFFERI, A. CME Information: Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology J H**, v. 90, n. February, p. 162–173, 2015a.

TEFFERI, A.; NOEL, P.; HANSON, C. A. Uses and abuses of JAK2 and MPL mutation tests in myeloproliferative neoplasms: A paper from the 2010 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 5, p. 461–466, 2011.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Genetics: CALR mutations and a new diagnostic algorithm for MPN. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 3, p. 125–126, 2014.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative Neoplasms A Contemporary Review. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 1, p. 97–105, 2016.

TEFFERI, A et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. **Leukemia**, v. 28, n. 7, p. 1472–7, 2014d.

TEFFERI, A. Myeloproliferative Neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. **Am J Hematol.**, v. 91, n. 1, p. epub ahead of print, 2015b.

TEFFERI, A; VARDIMAN, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 22, n. 1, p. 14–22, 2008.

- THEM, N. C. C.; KRALOVICS, R. Genetic basis of MPN: Beyond JAK2-V617F. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 8, n. 4, p. 299–306, 2013.
- TIBES, R.; MESA, R. A. Targeting hedgehog signaling in myelofibrosis and other hematologic malignancies. **Journal of hematology & oncology**, v. 7, n. 1, p. 18, 2014.
- VAINCHENKER, W. et al. Recent advances in understanding myelofibrosis and essential thrombocythemia [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status : v. 5, n. 0, p. 1–13, 2016.
- VAINCHENKER, W.; CONSTANTINESCU, S. N. REVIEW JAK / STAT signaling in hematological malignancies. **Oncogene**, n. May, p. 1–13, 2012.
- VANNUCCHI, A. M. et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. **Leukemia**, v. 27, n. 9, p. 1861–9, 2013.
- VANNUCCHI, A. M. et al. A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase III trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. **Haematologica**, v. 100, n. 9, p. 1139–1145, 2015.
- VARDIMAN, J.; HYJEK, E. World Health Organization Classification, Evaluation, and Genetics of the Myeloproliferative Neoplasm Variants. **Hematology**, v. 2011, n. 1, p. 250–256, 2011.
- VERGER, E. et al. Clinical and molecular response to interferon- α therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. **Blood**, v. 126, n. 24, p. 2585–2592, 2015.
- WADLEIGH, M.; TEFFERI, A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. **International Journal of Hematology**, v. 91, n. 2, p. 174–179, 2010.
- WARR, M. R.; PIETRAS, E. M.; PASSEGU??, E. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 3, n. 6, p. 681–701, 2011.
- XU, N. et al. A report on the co-occurrence of JAK2V617F and CALR mutations in myeloproliferative neoplasm patients. **Annals of Hematology**, p. 865–867, 2014.
- ZHANG, S.; LI, H.; LAI, R. Detection of JAK2 V617F mutation increases the diagnosis of myeloproliferative neoplasms. **Oncology Letters**, p. 735–738, 2014.
- ZHAO, R. et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 22788–22792, 2005.
- ZIEMIECKI, A.; HARPUR, A. G.; WILKS, A. F. JAK protein tyrosine kinases: Their role in cytokine signalling. **Trends in Cell Biology**, v. 4, n. 6, p. 207–212, 1994.

ANEXO I

	Comitê de Ética em Pesquisa Av. Joaquim Nabuco, 171 Graças Recife-PE CEP: 52011.000- Tel.: (81) 3182-4771 Correio-e: cep_hemope@gmail.com	
---	---	--

1 - DADOS SOBRE O PROJETO**PARECER FINAL: Nº. 013/2009**

Título do Projeto: Prevalência da Mutação JAK2 em Pacientes em Síndromes Mieloproliferativas Crônicas Atendidos na Fundação Hemope.

Instituição Solicitante: Faculdade Maurício de Nassau

Pesquisadora: Aderson da Silva Araújo

Identidade: 888.191SSP-PE **CPF:** 064.073.904-00 **Telefone:** 81 – 3182-4695

Finalidade: Conclusão do Curso de Bacharel em Biomedicina

Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia- Unilabe.

Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Orientado: Rafael Ramos da Silva

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Determinar a prevalência da mutação JAK2 V617F em pacientes com síndromes mieloproliferativas crônicas BCR/ABL negativas atendidos no Hospital de Hematologia e Hemoterapia da Fundação Hemope.

Objetivos Específicos: Padronizar no Laboratório na Unidade de Laboratórios Especializados da Fundação Hemope(UNILABE) a técnica descrita na literaturas para detecção da Mutação JAK2 V617F; Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com policitemia vera; Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com trombocitemia essencial e Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com mielofibrose.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 013/09, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 27/5/2009


Ana Lúcia de Sena
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa-HEMOPE

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

MAIORES DE 18 ANOS

(resolução 466/12)

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa "Caracterização clínica e molecular de pacientes com neoplasia mieloproliferativa crônica – cromossomo Ph negativo", que está sob a responsabilidade do pesquisador Pedro Luiz de França Neto (Endereço: Rua Joaquim de Oliveira Melo, nº 427, Maria Farinha, Paulista, PE, CEP: 53427-260 – Fone: (81) 9666-1908 – E-mail: pedro.neto229@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo (81) 9908-9382 - araujoarl@hotmail.com). Também participam também desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo (81) 9976-5136 - aderson@hotlink.com.br), Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (81) 9800-8105 – macbezerraufpe@gmail.com).

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o(a) Sr.(a) não será penalizado(a) de forma alguma. O(a) Sr.(a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

Nós verificamos que as Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas são doenças clonais com sintomas severos ao bem-estar do paciente, podendo causar hipertensão arterial sistêmica, trombose e hemorragia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas permitirá a detecção precoce e estratificação de risco destes pacientes. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 ml de sangue, obtidos useo agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, possa haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Ear, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

**Caracterização clínica e molecular de pacientes com neoplasia
mieloproliferativa crônica – cromossomo Ph negativo**

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo " Caracterização clínica e molecular de pacientes com neoplasia mieloproliferativa crônica – cromossomo Ph negativo ", como voluntário (a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data

Assinatura do participante

Impressão Digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: