



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Importância da Investigação da Mutação JAK2V617F em Pacientes com
Neoplasia Mieloproliferativa Crônica BCR/ABL negativa e sua
Associação com a Expressão da Proteína Antiapoptótica Survivina como
Marcador Diagnóstico.

Michelle Maccarini Barcelos

Florianópolis - SC, abril de 2011

Michelle Maccarini Barcelos

Importância da Investigação da Mutação JAK2V617F em Pacientes com
Neoplasia Mieloproliferativa Crônica BCR/ABL negativa e sua
Associação com a Expressão da Proteína Antiapoptótica Survivina como
Marcador Diagnóstico.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia, da Universidade Federal
de Santa Catarina, como requisito
para obtenção do título de Mestre
em Farmácia na Área de
Concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Maria Cláudia Santos
da Silva, PhD

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B242i Barcelos, Michelle Maccarini
Importância da investigação da mutação JAK2V617F em
pacientes com neoplasia mieloproliferativa crônica bcr/abl
negativa e sua associação com a expressão da proteína
antiapoptótica survivina como marcador diagnóstico
[dissertação] / Michelle Maccarini Barcelos ; orientadora,
Maria Cláudia Santos da Silva. - Florianópolis, SC, 2011.
188 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Neoplasias. 3. Proteínas. I. Silva, Maria
Cláudia Santos da. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Michelle Maccarini Barcelos

Importância da Investigação da Mutação JAK2V617F em Pacientes com Neoplasia Mieloproliferativa Crônica BCR/ABL negativa e sua Associação com a Expressão da Proteína Antiapoptótica Survivina como Marcador Diagnóstico.

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para a obtenção do Título de:

Mestre em Farmácia

E aprovada na sua versão final em 25 de fevereiro de 2011, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração de Análises Clínicas.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Maria Cecília Menks (UFSC – Membro Titular)

Prof^a. Dra. Maria Luiza Bazzo (UFSC – Membro Titular)

Prof^a. Dra. Thaís Sincero (UFSC – Membro Titular)

Prof^a. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 25 fevereiro de 2011

Dedico este trabalho à minha mãe e ídola, Alzira Maccarini Barcelos, que sempre foi meu maior exemplo de força, garra e determinação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida e está sempre comigo, iluminando os meus pensamentos e guiando os meus passos.

Aos meus pais, Lourival João Barcelos (*in memoriam*) e Alzira Maccarini Barcelos, que sempre foram os maiores incentivadores dos meus estudos. Muito obrigada por sempre confiarem em mim.

Aos meus irmãos, Elton, Edmilson, Edylson e Giselle. Meu amor por vocês é incondicional.

À minha orientadora, segunda mãe e amiga Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia. Sinto-me privilegiada por ter uma orientadora tão humana e competente como você.

Ao meu namorado amado, Alessandro, que mesmo à distância e com milhões de compromissos sempre tinha uma palavra de motivação. O teu amor e compreensão foram fundamentais para a realização deste trabalho. Te amo mais!

À toda equipe do laboratório, Arthur, Chris C, Chris N, Graciele, Haíra, Karina, Letícia, Mariana, Pâmela, Simoni, Susie, Toni e em especial para Aline Lini, Manoela e Marley por todo apoio acadêmico, técnico e moral. Vou lembrar sempre com muito carinho de vocês.

À minha amiga de graduação, pós-graduação e de vários outros momentos, Ana Carolina. Você merece muito um agradecimento especial não só pela infinita ajuda na realização deste trabalho, mas principalmente pelo carinho que tenho pela nossa amizade.

À toda equipe do laboratório de Patologia/CEPON, Ana B, Carol, Digo, Fabi, Lee, Marta, Marli, Naná e Silvia. Não tenho palavras pra agradecer tudo que vocês fizeram por mim. Muito obrigada por toda ajuda e por tornarem tão agradável o nosso ambiente de trabalho.

À minha irmãzinha por opção, Caris. Amis, você é um anjo na minha vida. O laço fraterno que nos une com certeza é pra vida toda.

À minha “maris” querida, Cris Frassetto. Só tenho que te agradecer por todas as horas de desabafo e por todos os momentos de felicidade compartilhados.

Às minhas amigas desde sempre e pra sempre, Dai, Gika, Ká, Paty e Paulinha. Vocês são um pedacinho de mim, e não existe distância capaz de nos separar.

Às minhas nutricionistas preferidas, Gabilela e Nessita. Como foi bom vocês terem entrado na minha vida.

Às minhas queridas amigas da universidade. Vocês são as responsáveis por todas as memórias divertidas do meu período de graduação. E

mesmo as que hoje se escondem no oeste ou no sul do mundo, vão estar pra sempre no meu coração.

A Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Bazzo, pelas inúmeras ajudas e por esclarecer todas minhas dúvidas sobre biologia molecular.

A Prof.^a Dr.^a Rosemeri Maurici da Silva pela ajuda na estatística e super boa vontade mesmo em épocas festivas e estando de férias.

Aos médicos do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário – HU/UFSC e do Centro de Pesquisas Oncológicas – CEPON pelo encaminhamento das amostras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina que ofereceu condições para a realização deste mestrado.

A FAPESC pelo suporte financeiro.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC) são neoplasias originadas por uma proliferação clonal de um progenitor hematopoiético pluripotencial. Em 1951, William Dameshek descreveu a relação existente entre a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP), propondo que essas doenças, juntamente com a leucemia mieloide crônica (LMC) e a eritroleucemia, fossem agrupadas em uma categoria geral de síndromes mieloproliferativas. No entanto, ao longo dos anos, essa classificação foi reavaliada e, atualmente, a PV, a TE e a MFP são denominadas neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPCs) BCR/ABL negativas. De acordo com a revisão dos critérios adotados para o diagnóstico das NMPCs, realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, a presença da mutação JAK2V617F é considerada critério de maior importância para o diagnóstico de PV, e, na TE e MFP representa um marcador clonal. A JAK2V617F ativa constitutivamente a proteína transdutora de sinal STAT3, que está relacionada com a expressão da proteína antiapoptótica survivina e com a progressão maligna. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a prevalência da mutação JAK2V617F em pacientes com diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa, e associar com a expressão da proteína antiapoptótica survivina, como marcador diagnóstico, e com dados laboratoriais e clínicos dos pacientes. Do total de 54 casos incluídos no estudo, 32 casos (59,3%) apresentaram a mutação JAK2V617F e 22 casos (40,7%) foram negativos. A neoplasia de maior prevalência foi a TE, sendo diagnosticada em 61,1% dos casos, seguida da PV, diagnosticada em 26% dos casos. Não foi observada diferença estatística significativa da presença da mutação entre homens (57,7%) e mulheres (60,7%). Os indivíduos positivos para a mutação JAK2V617F apresentaram uma mediana de idade maior (61,5 anos) do que os indivíduos sem a mutação (52,5 anos). Os resultados deste trabalho não mostraram nenhuma associação entre a presença da mutação JAK2V617F e a ocorrência de trombose e/ou esplenomegalia. A presença da mutação JAK2V617F não está associada com a ocorrência de anormalidades laboratoriais nos indivíduos com MFP; já os pacientes positivos para mutação JAK2V617F e diagnosticados com PV e TE tiveram aumento significativo na contagem de eritrócitos e plaquetas, aumento na mediana de idade e na leucometria, respectivamente. A expressão da proteína

survivina não foi detectada nas medulas ósseas dos indivíduos deste estudo, independente da presença ou ausência da mutação JAK2V617F. As evidências obtidas nesse estudo permitem concluir que, diferente da importância bem definida como valor diagnóstico, a relevância prognóstica da presença da mutação JAK2V617F nos casos de NMPCs BCR/ABL negativa permanece controversa. Além disso, a investigação da expressão da proteína survivina em biópsia de medula óssea não serve como um bom marcador para o diagnóstico dos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa.

Palavras-chave: Neoplasias mieloproliferativas crônicas. JAK2. JAK2V617F. Survivina.

ABSTRACT

The chronic myeloproliferative neoplasms (CMPNs) arise from clonal proliferation of hematopoietic stem cells. In 1951, William Dameshek described the relationship between polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF), suggesting that these diseases, as well as chronic myeloid leukemia (CML) and erythroleukemia, should all be classified as a single disease type, which he proposed to call the myeloproliferative syndromes. However, over the years, this classification was revised and, currently, PV, ET and PMF are called CMPNs BCR/ABL negative. In the 2008 revision of the WHO diagnostic criteria for MPN, mutation expression for JAK2V617F was considered a major criteria for PV diagnosis, and a clonal marker for ET and MFP. The JAK2V617F constitutively activates the signal transducer STAT3 protein, which is related to the expression of the antiapoptotic protein survivin and to cancer progression. Thus, the aim of this study was to investigate the prevalence of the JAK2V617F mutation in patients with CMPN BCR/ABL negative, and link with the expression of survivin antiapoptotic protein as a diagnostic marker and with laboratory and clinical data of patients. Of the 54 cases included in the study, 32 cases (59.3%) showed the presence of the JAK2V617F mutation, and 22 cases (40.7%) were negative. The neoplastic with the higher prevalence was the TE, which was diagnosed in 61.1% of cases, followed by the PV, which was diagnosed in 26% of cases. There was no statistically relevant difference from the presence of the mutation between men (57.7%) and women (60.7%). Individuals with positive results for the JAK2V617F mutation had a higher median age (61.5 years) than individuals without the mutation (52.5 years). The results of this study did not show any association between the presence of JAK2V617F mutation and thrombosis and/or splenomegaly. The presence of the JAK2V617F mutation is not linked with the occurrence of laboratory abnormalities in patients with MFP, while patients positive for JAK2V617F mutation and diagnosed with PV and ET had a significant increase in erythrocyte and platelet count, and an increase in the median age and leukocyte count, respectively. The expression of survivin protein was not detected in the bone marrow of the individuals analyzed in this study, regardless of the presence or not of the JAK2V617F mutation. With the compilation of the evidence obtained in this study, we reach the conclusion that, unlike the importance for the diagnostic, the prognostic relevance of the presence of the JAK2V617F

mutation in cases of NMPCs BCR/ABL negative remains controversial. Furthermore, the investigation of the survivin protein expression in bone marrow biopsy is not applicable as a good marker for the diagnosis of patients with CMPN BCR/ABL negative.

Keywords: Chronic myeloproliferative neoplasms. JAK2. JAK2V617F. Survivin.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Representação esquemática do gene JAK2 mutado..... | 45 |
| Figura 2 | Representação das vias de sinalização ativadas pela proteína JAK2..... | 46 |
| Figura 3 | Representação das duas hipóteses sobre a patogênese das NMPCs BCR/ABL negativas..... | 52 |
| Figura 4 | Representações dos mecanismos envolvidos na perda da heterozigozidade do cromossomo 9p..... | 54 |
| Figura 5 | Representação da reação em cadeia da polimerase alelo específica para amplificação do gene JAK2 e JAK2V617F..... | 68 |
| Figura 6 | Gel de integridade de DNA..... | 75 |
| Figura 7 | Gel apresentando a padronização da reação em cadeia da polimerase alelo específica..... | 76 |
| Figura 8 | Gel de agarose 1,5%..... | 77 |
| Figura 9 | Gel de agarose 2,5%..... | 78 |
| Figura 10 | Marcação positiva da proteína survivina pela técnica de imuno-histoquímica em corte histológico de carcinoma de mama..... | 79 |
| Figura 11 | Marcação negativa para a proteína survivina pela técnica de imuno-histoquímica em corte histológico de medula óssea sem alterações..... | 80 |

Figura 12 Marcação negativa para a proteína survivina pela técnica de imuno-histoquímica em corte histológico de medula óssea de pacientes com neoplasia mieloproliferativa crônica BCR/ABL negativa..... 87

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Quadro 1 | Critérios diagnósticos para PV de acordo com a OMS 2008..... | 37 |
| Quadro 2 | Critérios diagnósticos para TE de acordo com a OMS 2008..... | 40 |
| Quadro 3 | Critérios diagnósticos para MFP de acordo com a OMS 2008..... | 43 |
| Quadro 4 | Descrição das sequências de oligonucleotídeos utilizados..... | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Distribuição dos casos com diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa que foram submetidos à investigação da mutação JAK2V617F, de acordo com o gênero..... | 81 |
| Tabela 2 | Distribuição dos casos com diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa que foram submetidos à investigação da mutação JAK2V617F, de acordo com a idade..... | 81 |
| Tabela 3 | Frequência de esplenomegalia e/ou trombose nos pacientes com diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa distribuídos de acordo com a presença ou ausência da mutação JAK2V617F..... | 83 |
| Tabela 4 | Valores médios da contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, índice de hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas, de acordo com a ausência ou a presença da mutação JAK2V617F... | 84 |
| Tabela 5 | Frequência dos subtipos de NMPCs BCR/ABL negativas de acordo com a presença ou ausência da mutação JAK2V617F..... | 85 |
| Tabela 6 | Valores médios de idade, contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, índice de hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas, de acordo com a ausência ou a presença da mutação JAK2V617F para cada subtipo de NMPC BCR/ABL negativa..... | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AS-PCR | Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específica |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Desorribonucleotídeo trifosfatado |
| DUA | Dissomia Uniparental Adquirida |
| EPO | Eritropoetina |
| IAP | Proteínas Inibidoras de Apoptose |
| JAK | <i>Janus Kinase</i> |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| LMA | Leucemia Mielóide Aguda |
| LMC | Leucemia Mielóide Crônica |
| MF | Mielofibrose |
| MFP | Mielofibrose Primária |
| NMPC | Neoplasia Mieloproliferativa Crônica |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PH | Perda da Heterozigozidade |
| PV | Policitemia Vera |
| SMD | Síndrome Mielodisplásica |
| STAT | Proteína ativadora de transcrição e transdutora de sinal |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TE | Trombocitemia Essencial |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 31 |
| 1.1 Introdução geral..... | 33 |
| 1.2 Neoplasias mieloproliferativas crônicas..... | 34 |
| <i>1.2.1 Policitemia vera.....</i> | <i>34</i> |
| <i>1.2.2 Trombocitemia essencial.....</i> | <i>37</i> |
| <i>1.2.3 Mielofibrose primária.....</i> | <i>40</i> |
| 1.3 Estrutura e mecanismos regulatórios do gene JAK2..... | 44 |
| 1.4 Atividade quinase da proteína JAK2 e a mutação JAK2V617F..... | 45 |
| 1.5 Envolvimento da mutação JAK2V617F e as vias de apoptose..... | 48 |
| 1.6 Complexidade genética das NMPCs..... | 51 |
| 1.7 Diagnóstico laboratorial..... | 56 |
| 2 OBJETIVOS..... | 59 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 61 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 61 |
| 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS..... | 63 |
| 3.1 Pacientes..... | 65 |
| <i>3.1.1 Aspectos éticos.....</i> | <i>65</i> |
| <i>3.1.2 População do estudo.....</i> | <i>65</i> |

| | |
|---|----|
| 3.2 Métodos | 65 |
| 3.2.1 <i>Detecção da mutação JAK2V617F</i> | 65 |
| <u>3.2.1.1 Amostras</u> | 65 |
| <u>3.2.1.2 Extração de DNA</u> | 66 |
| <u>3.2.1.3. Reação em cadeia da polimerase alelo específica (AS-PCR)</u> | 67 |
| 3.2.2 <i>Detecção da proteína antiapoptótica survivina</i> | 69 |
| <u>3.2.2.1 Amostras</u> | 69 |
| <u>3.2.2.2 Reação de Imuno-histoquímica</u> | 69 |
| 3.3 Métodos estatísticos | 70 |
| 3.4 Análise dos prontuários | 71 |
| 4 RESULTADOS | 73 |
| 4.1 Padronização da metodologia para detecção da mutação JAK2V617F | 75 |
| 4.1.1. <i>Padronização da extração de DNA</i> | 75 |
| 4.1.2 <i>Padronização da metodologia de AS-PCR</i> | 76 |
| 4.2. Padronização da investigação da expressão da proteína survivina | 78 |
| 4.2.1 <i>Padronização da técnica de imuno-histoquímica</i> | 78 |
| 4.3 Detecção da mutação JAK2V617F nas amostras de sangue periférico dos pacientes em investigação de NMPC BCR/ABL negativa | 80 |

| | |
|---|------------|
| 4.4 Associação da expressão da mutação JAK2V617F com a avaliação clínica, com os dados laboratoriais e com os subtipos de NMPCs BCR/ABL negativas..... | 82 |
| 4.5 Análise da expressão da proteína antiapoptótica survivina nas biópsias de medula óssea e sua associação com a presença da mutação JAK2V617F nos pacientes com NMPCs BCR/ABL negativas..... | 87 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 89 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 97 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 101 |
| Anexos..... | 129 |
| Anexo 1: Aprovações do Projeto de Pesquisa pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HU-UFSC e CEPON..... | 131 |
| Anexo 2: Termos de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 137 |
| Anexo 3: Abordagem molecular no diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR/ABL negativas Artigo Submetido à Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia..... | 157 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução geral

Em 1951, William Dameshek descreveu a relação existente entre a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP), propondo que essas doenças, juntamente com a leucemia mieloide crônica (LMC) e a eritroleucemia, fossem agrupadas em uma categoria geral de síndromes mieloproliferativas (GOLDMAN, 2005; WALZ et al., 2008). No entanto, ao longo dos anos, essa classificação foi reavaliada e, atualmente, a PV, a TE e a MFP são denominadas de neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPCs) BCR/ABL negativas (HA FERLACH, 2008). Essas três neoplasias compartilham algumas características clínicas, como a presença de células-tronco hematopoiéticas independentes de fatores de crescimento para proliferação, hiperplasticidade da medula óssea, risco aumentado de eventos trombóticos e de hemorragia, conversão espontânea à leucemia aguda e fibrose da medula óssea (SCHAFER, 2006).

Na literatura, algumas evidências sugerem que características moleculares observadas nas NMPCs são ocasionadas devido a desordens no processo de sinalização celular hematopoiético. Por exemplo, Gitler e colaboradores (2004) mostraram que a superexpressão de fatores de crescimento, que atuam como mediadores de sinalização celular, é capaz de induzir NMP em ratos. Já Roder e colaboradores (2001) demonstraram que células hematopoiéticas de pacientes com NMPCs expressam moléculas de sinalização constitutivamente ativadas. Por último, Axelrad e colaboradores (2000) observaram que progenitores hematopoiéticos são hipersensíveis a vários fatores de crescimento na PV, na MFP e na TE. Com base nessas e em outras evidências, alguns grupos de pesquisadores trabalharam com a hipótese de que anormalidades na proteína *Janus kinase 2* (JAK2) poderiam estar relacionadas às NMPCs, uma vez que essa proteína é a responsável pela ativação de várias moléculas envolvidas nos processos de sinalização celular (KAUSHANSKY, 2005). Essa hipótese foi confirmada em 2005, quando quatro grupos diferentes de pesquisa identificaram uma mutação pontual no éxon 14 do gene JAK2, que acarreta a substituição de uma valina por uma fenilalanina no códon 617 da proteína (JAK2V617F). Essa mutação foi descrita em mais de 95% dos casos de PV e em aproximadamente 50% dos casos de TE e de MFP (BAXTER et al., 2005; JAMES et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005; ZHAO et al., 2005; KOTA, CACERES e CONSTANTINESCO, 2008). A incidência da mutação JAK2V617F em PV, TE e MFP foi

confirmada por vários estudos subsequentes, os quais também verificaram a sua ausência em células normais e raros aparecimentos em outras desordens hematológicas (KRALOVICS et al., 2005; SCOTT et al., 2005; NELSON e STEENSMA, 2006; KAUSHANSKY, 2007).

1.2 Neoplasias mieloproliferativas crônicas

As desordens hematológicas malignas são amplamente classificadas em mieloides e linfoides, de acordo com as características morfológicas e imunofenotípicas da população celular clonal afetada (TEFFERI e GILLILAND, 2005). Entre as desordens mieloides estão as neoplasias mieloproliferativas, as quais são originadas por uma proliferação clonal de um progenitor hematopoiético pluripotencial. Essas neoplasias são caracterizadas pela produção excessiva de células sanguíneas maduras da linhagem mielóide, as quais são independentes e/ou hipersensíveis às citocinas para sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (KRALOVICS et al., 2005; CAMPBELL e GREEN, 2006; SCOTT et al., 2007; KOTA, CACERES e CONSTANTINESCU, 2008).

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu novos critérios para o diagnóstico e classificação das neoplasias mieloides (TEFFERI e VARDIMAN, 2008). De acordo com esses critérios, as neoplasias mieloproliferativas foram classificadas em: leucemia mielóide crônica, policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária, leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica (LEC), síndrome hipereosinofílica (SHE), doença do mastócito (DM) e neoplasias mieloproliferativas sem classificação (NMPSC) (HAFERLACH et al., 2008).

1.2.1 Policitemia vera

A PV é uma neoplasia caracterizada pelo aumento da eritropoiese na medula óssea, que resulta em um aumento absoluto do número de eritrócitos no sangue periférico e pode apresentar leucocitose, trombocitose e esplenomegalia (THIELE et al., 2008).

Esta neoplasia apresenta praticamente a mesma incidência em homens e mulheres, sendo mais comum em indivíduos idosos. Os sintomas clínicos são atribuídos, na sua maioria, ao aumento de células hematopoiéticas no sangue periférico e à diminuição do fluxo sanguíneo. O indivíduo com diagnóstico de PV pode apresentar

coloração avermelhada na face, prurido, cefaléia, tonturas, zumbidos, distúrbios visuais, dispnéia, cansaço ou fraqueza. A falta de especificidade dos sintomas apresentados pelos pacientes com PV pode contribuir para a falha do diagnóstico (THIELE et al., 2008).

O curso clínico da PV pode evoluir para outras doenças malignas com características mais agressivas e de menor sobrevida, como a mielofibrose (MF) e a leucemia mieloide aguda (LMA). De acordo com alguns estudos, o risco de um paciente com PV desenvolver MF é aproximadamente de 10% a 20% (ELLIS et al., 1986; GRUPPO ITALIANO STUDIO POLICITEMIA, 1995), já para o desenvolvimento de LMA o risco é de 1,5% (BERK et al., 1981). A determinação exata da incidência dessas transformações é difícil devido ao uso frequente, pelos pacientes, de medicamentos que por si só são leucemogênicos (SCHAFER, 2006).

Entre as principais causas de morbidade e de mortalidade na PV estão as complicações vasculares, os eventos trombóticos e os sangramentos. Os problemas hemorrágicos envolvem, quase sempre, as plaquetas, e resultam em sangramentos espontâneos na superfície da pele e de algumas mucosas (SCHAFER, 2006). O risco de desenvolvimento de trombose aumenta em indivíduos com idade avançada, história prévia de trombose e presença de fatores de risco vascular, como hipercolesterolemia, tabagismo e outros. (PEARSON, 2002).

O tratamento de escolha para PV consiste em sangrias com o objetivo de manter o hematócrito abaixo dos níveis de referência (TEFFERI, 2003). O índice de hematócrito acima de 44% aumenta consideravelmente o risco de eventos vasculares e trombóticos (SCHAFER, 2006). Além das sangrias, também são utilizados tratamentos com medicamentos citoredutores para pacientes com PV. Apesar do seu potencial leucemogênico, a hidroxuréia permanece o agente mielosupressor de primeira escolha (PRCHAL, 2003; FINAZZI e BARBUI, 2005). Em indivíduos jovens, particularmente em mulheres em idade fértil, o tratamento deve ser substituído por interferon alfa (SCHAFER, 2006).

Existem estudos que correlacionam o número de células com a presença da mutação JAK2V617F com dados clínicos dos pacientes com PV, porém a relevância para o prognóstico é incerta (DUPONT et al., 2007; TEFFERI e ELLIOTT, 2007; VANNUCCHI et al., 2007). Enquanto alguns autores relatam que o número de células mutadas está associado com pior prognóstico e transformação fibrótica, trombose e

necessidade de quimioterapia (TEFFERI et al., 2007; VANNUCCHI et al., 2007), outros grupos, como o de Sirhan e colaboradores (2008), mostraram que o número de células mutadas está diretamente relacionado com a sensibilidade ao tratamento quimioterápico com hidroxiuréia.

A mutação JAK2V617F está presente em 90% dos casos de PV. Cerca de 25%-30% dos casos são homozigóticos para a mutação (KHWAJA, 2006; PANANI, 2009). O impacto da descoberta da mutação JAK2V617F foi principalmente para o diagnóstico diferencial de PV (TEFFERI e GILLILAND, 2007; ANASTASI, 2009). Antes da associação da mutação JAK2V617F com a PV, o principal problema no diagnóstico diferencial dessa doença era relacionado a outras doenças que também causavam eritrocitose. No entanto, com a descrição das mutações envolvendo o gene JAK2, esse problema foi amenizado. Além da JAK2V617F, foi descoberta uma mutação em outro éxon do gene JAK2 (éxon 12), descrito em 80% dos casos negativos para JAK2V617F. Com isso, uma das duas mutações está presente em 99% dos casos de PV (SCOTT et al., 2007).

Os novos critérios designados pela OMS em 2008, para o diagnóstico de PV, podem ser observados no Quadro 1. Na maioria dos casos, a verificação de aumento nos níveis de hemoglobina, hematócrito ou hemácias acima dos limites normais, com níveis normais ou baixos de eritropoetina, já são suficientes para comprovar que a proliferação eritróide não é devida a causas fisiológicas. A positividade para a mutação JAK2V617F caracteriza o diagnóstico de PV. Nos casos negativos, pode-se pesquisar a presença da mutação no éxon 12 do gene JAK2 (ANASTASIS, 2009).

Quadro 1. Critérios diagnósticos para PV de acordo com a OMS (2008)

| POLICITEMIA VERA (PV)* | |
|-------------------------------|---|
| Maior importância | 1- Hgb > 18,5 g/dl (homens), Hgb > 16,5 g/dl (mulheres) Ou Hgb > 17 g/dl (homens), Hgb > 15 g/dl (mulheres) se associado com aumento \geq 2 g/dl do valor basal sem que esteja atribuído a correção por deficiência por ferro Ou Aumento da massa eritrocitária > 25% acima do valor normal 2- Presença de mutação JAK2V617F |
| Menor importância | 1- Mieloproliferação das três linhagens na MO 2- Nível de Epo sérica abaixo do normal 3- Crescimento de CEE |

Adaptado de TEFFERI e VARDIMAN, 2008.

Abreviações: CEE, colônia eritroide endógena; Epo, eritropoetina; Hgb, hemoglobina; OMS, Organização Mundial de Saúde.

*Para o diagnóstico de Policitemia Vera (PV), deve-se ter todos os critérios de maior importância e um de menor importância ou o primeiro critério de maior importância juntamente com dois de menor importância.

1.2.2 Trombocitemia essencial

A TE é definida pela elevação persistente da contagem de plaquetas no sangue periférico devido ao aumento de produção na

medula óssea e com ausência de causa sistêmica para a trombocitose (THIELE et al., 2008).

Cerca de 20% dos pacientes são assintomáticos para a doença. Entre as características clínicas mais comuns estão: trombose, cefaléia, distúrbios visuais e hemorragia espontânea ou após um trauma (THIELE et al., 2008). A esplenomegalia ocorre em 30% dos casos, porém, existem relatos de casos de indivíduos com diagnóstico de TE com baço atrofiado devido a infarto (LANDOLFI, ROCCA e PATRONO, 1995).

A média de sobrevida desses indivíduos é de mais de 20 anos. Entre as principais causas de morbidade e mortalidade estão a trombose e a hemorragia (THIELE et al., 2008; SCHAFER, 2006). Além disso, também pode ocorrer a transformação para LMA e MF. O aumento do risco para a transformação para mielofibrose parece estar associado ao tratamento com anagrelida (HARRISON et al., 2005). Já a transformação para leucemia aguda ou síndrome mielodisplásica (SMD) raramente ocorre sem a realização de uma terapia com agente quimioterápico leucemogênico (FINAZZI et al., 2000; SCHAFER, 2006).

O tratamento quimioterápico de primeira escolha para TE é a hidroxiuréia e tem como objetivo manter a contagem de plaquetas abaixo de $600 \times 10^9/L$ (HARRISON et al., 2005). Outros tratamentos, com interferon alfa e anagrelida, também parecem ser efetivos. Como terapia de suporte, para casos com eventos trombóticos, são utilizados 75 mg/dia de aspirina em conjunto com a terapia citoreduzora. Contudo, a terapia antiplaquetária deve ser utilizada com cautela devido ao alto risco de sangramento (SCHAFER, 2006).

A mutação JAK2V617F está presente em 23% a 75% dos casos de TE, no entanto, o impacto desta mutação no fenótipo clínico é muito debatido. A mutação JAK2V617F e a quantidade de células mutadas não parecem ter relevância prognóstica, pois a sua presença não altera a sobrevida nem o risco de transformação para leucemia aguda dos indivíduos com diagnóstico de TE (WOLANSKYJ et al., 2005; KITTUR et al., 2007). São reportados estudos discrepantes sobre a presença da mutação JAK2V617F e o número de células mutadas associados com episódios trombóticos em pacientes com TE (CAMPBELL et al., 2005; CAROBBIO et al., 2007; VANNUCCHI et al., 2007, ANTONIOLI et al., 2008). Enquanto Campbell e colaboradores (2005) demonstram que a presença da mutação tem relação com eventos trombóticos arteriais, Carobbio e colaboradores (2007) mostram que os eventos trombóticos são similares em pacientes positivos e negativos para a mutação JAK2V617F (ANTONIOLI et al.,

2005; WOLANSKYJ et al., 2005, CAROBBIO et al., 2008). A idéia de que pacientes com TE positivos para mutação JAK2V617F representam um subtipo biologicamente distinto da doença é suportada pela observação de que esses indivíduos são mais sensíveis à hidroxiuréia, ou seja, doses mais baixas são suficientes para o controle do número de plaquetas, hemoglobina e leucócitos (CAMPBELL et al., 2005; SCHAFER 2006).

Os critérios para o diagnóstico de TE foram revisados pela OMS, em 2008 (Quadro 2). Antes desses novos critérios, era necessário uma contagem de plaquetas de $600 \times 10^9/L$ ou mais para se considerar o diagnóstico de TE; já pelos critérios revisados, essa contagem baixou para $450 \times 10^9/L$ ou mais (TEFFERI e VARDIMAN, 2008; ANASTASI, 2009). Esta mudança foi realizada na tentativa de diagnosticar os casos no início da doença. Outra mudança foi a inclusão da detecção da mutação JAK2V617F ou outro marcador clonal. A mutação no gene JAK 2 está presente em aproximadamente 50% dos casos de TE e afasta a hipótese de trombocitose reativa (CAMPBELL et al., 2005).

Quadro 2. Critérios diagnósticos para TE de acordo com a OMS (2008)

| TROMBOCITEMIA ESSENCIAL (TE)* | |
|--------------------------------------|--|
| Maior importância | 1- Contagem de plaquetas $\geq 450.000/\text{mm}^3$ 2- Proliferação de megacariócitos maduros e de tamanho aumentado 3- Nenhum critério diagnóstico da OMS para LMC, PV, MFP, SMD ou outra neoplasia mieloide 4- Detecção da mutação JAK2V617F ou de outro marcador clonal Ou Nenhuma evidência de trombocitose reativa |

Adaptado de TEFFERI e VARDIMAN, 2008.

Abreviações: LMC, leucemia mieloide crônica; MFP, mielofibrose primária; SMD, síndrome mielodisplásica; OMS, Organização Mundial de Saúde.

*Para o diagnóstico de Trombocitemia Essencial (TE), deve-se ter todos os critérios de maior importância.

1.2.3 Mielofibrose primária

A MFP, também conhecida como fibrose idiopática ou mielofibrose com metaplasia mieloide, é uma neoplasia clonal de células tronco hematopoiética, caracterizada por uma intensa reação no estroma da medula óssea, ocasionando fibrose colágena, osteoclerose e neoangiogênese (TEFFERI, 2000; CERVANTES, 2007). A patogênese da MFP não está bem elucidada, mas existem grandes evidências de que várias citocinas, como o fator de transformação de crescimento (TGF), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) e fator de necrose tumoral (TNF) contribuem para essas mudanças que ocorrem no micro-ambiente da medula óssea (ETIENNE et al., 2009; HOLLE et al., 2010).

A MFP é mais frequente em indivíduos idosos. A idade média é de 60 anos e não existem diferenças significantes para a frequência da

doença entre homens e mulheres (THIELE et al., 2008). A MFP é considerada uma neoplasia hematológica rara, com incidência estimada de 0,3 a 1,5 casos para cada 100.000 indivíduos ao ano (VARRICHIO, MANCINI e MIGLIACCIO, 2009).

Em 25% dos casos, a MFP é assintomática e em geral, a suspeita clínica ocorre pelos achados anormais no sangue periférico ou devido à esplenomegalia. A maioria dos pacientes apresenta fadiga e perda de peso. Entretanto, alguns sintomas menos frequentes podem manifestar-se, como a febre, a sudorese noturna e o sangramento (THIELE et al., 2008).

Os pacientes com MFP têm, em média, uma sobrevida de 5 a 7 anos; entretanto, os pacientes jovens e com características prognósticas favoráveis podem sobreviver com a doença por mais de 10 anos. Como fatores prognósticos favoráveis podem-se incluir ausência de sintomas, concentração de hemoglobina de 10g/dL ou mais, contagem de plaquetas de $100 \times 10^9/L$ ou mais e ausência de hepatomegalia. Já os fatores de risco incluem idade avançada, anemia, leucocitose, sintomas constitucionais, e presença de blastos no sangue periférico do paciente (TEFFERI, 2000; CERVANTES, 2007).

A única alternativa de cura para a MFP é através de transplante alogênico de medula óssea, porém, este somente é indicado para indivíduos jovens e, mesmo assim, o risco de morte é alto. Não existe nenhuma outra terapia que prolongue a sobrevida ou previna a progressão da doença, apenas são utilizadas algumas terapias de suporte paliativo, como a hidroxiuréia, o interferon e corticoesteróides (HOLLE et al., 2010).

Como descrito anteriormente, a mutação JAK2V617F também foi observada na MFP. Registrou-se a presença desta mutação em 35% a 57% dos pacientes com diagnóstico de MFP, porém, o impacto da presença da mutação na sobrevida desses pacientes ainda não é claro. Resultados discrepantes são reportados sobre a taxa de transformação leucêmica. Tefferi e colaboradores (2008) mostraram que a presença da mutação não interfere na presença de trombose, na sobrevida geral e na sobrevida livre de transformação leucêmica. Já os resultados que avaliam a quantidade de células mutadas nos pacientes com MFP demonstram que pacientes com menor número de células mutadas possuem menor sobrevida livre de leucemia. Em outro estudo, que avalia a resposta à terapia com hidroxiuréia, Sirhan e colaboradores (2008) mostraram que pacientes com MFP e positivos para a mutação

JAK2V617F apresentaram uma melhor resposta à terapia do que os pacientes negativos para a mutação.

Os critérios para o diagnóstico de MFP definidos pela OMS, em 2008, mudaram quando comparados aos critérios definidos na terceira edição, em 2001 (Quadro 3). Segundo a OMS-2008, os critérios para o diagnóstico são compostos por 3 parâmetros de maior importância e 4 de menor importância (TEFFERI e VARDIMAN, 2008). Os parâmetros de maior importância incluem características morfológicas e moleculares. Entre as características moleculares estão a presença da mutação JAK2V617F, a mutação no receptor de trombopoetina MPLW515K/L ou alguma anormalidade citogenética clonal (PARDANANI et al., 2006). Esta última parece estar presente em 35% dos casos e inclui del(13q), del(20q) e anormalidades envolvendo 1q, embora nenhum desses seja específico para MFP (REILLY et al., 1997). Entre os critérios de menor importância estão características clínicas (esplenomegalia), achados laboratoriais (anemia e altos níveis de lactato desidrogenase - LDH) e características morfológicas das células do sangue periférico (leucoeritroblastose). O diagnóstico de MFP é determinado quando estão presentes todos os 3 parâmetros de maior importância e 2 de menor importância (ANASTASI, 2009).

Quadro 3. Critérios diagnósticos para MFP de acordo com a OMS (2008)

| MIELOFIBROSE PRIMÁRIA (MFP)* | |
|-------------------------------------|---|
| Maior importância | <p>1- Proliferação de megacariócitos e atipia acompanhada de fibrose reticulínica e colágena; Ou Na ausência de fibrose reticulínica, as mudanças nos megacariócitos devem estar acompanhadas de aumento da celularidade medular, proliferação granulocítica e geralmente diminuição da eritropoiese.</p> <p>2- Nenhum critério diagnóstico da OMS para LMC, PV, SMD ou outra neoplasia mielóide.</p> <p>3- Detecção da mutação JAK2V617F ou de outro marcador clonal; Ou Nenhuma evidência de fibrose medular reativa.</p> |
| Menor importância | <p>1- Leucoeritroblastose</p> <p>2- Aumento dos níveis de LDH sérico</p> <p>3- Anemia</p> <p>4- Esplenomegalia palpável</p> |

Adaptado de TEFFERI e VARDIMAN, 2008.

Abreviações: LMC, leucemia mielóide crônica; SMD, síndrome mielodisplásica; OMS, Organização Mundial de Saúde.

1.3 Estrutura e mecanismos regulatórios do gene JAK2

O gene JAK2 é membro da família *Janus kinases* (JAKs) juntamente com mais três genes: JAK1, JAK3 e Tyk2 (HARPUR et al., 1992; JONES et al., 2005; STEENSMA et al., 2005; TEFERI e GILLILAND, 2005; PANANI, 2009). Essa família possui sete domínios homólogos (JH), denominados de 1 a 7, além de uma porção carboxila inicial e de uma amino terminal. Partindo do domínio carboxila em direção ao amino terminal, o domínio JH1 representa o domínio quinase, e o JH2, o domínio pseudoquinase; o JH3 e o JH4 são domínios homólogos do tipo Src 2 (SH2), enquanto os domínios JH5 a JH7 contêm domínios homólogos 4,1, ezrina, radixina, moesina (FERM) (WILKS et al., 1991; GIRAULT et al., 1999; KOTA, CACERES e CONSTANTINESCO, 2008). Estruturalmente, as JAKs podem ser divididas em duas partes. A parte amino terminal é importante para a ligação aos receptores e possui funções estabilizadoras de superfície; já os domínios quinases (parte carboxila terminal) são cruciais para a regulação do processo de sinalização celular (HUANG, CONSTANTINESCO e LODISH, 2001; RADTKE et al., 2002; RAGIMBEAU et al., 2003; ROYER et al., 2005; KOTA, CACERES e CONSTANTINESCO, 2008). Estudos realizados revelam importante ação do domínio FERM nas interações das JAKs com receptores de citocina transmembrana e na regulação da atividade quinase (CHEN et al., 1997; GHORESCHI, LAURENCE e O'SHEA, 2009). Já o papel do domínio SH2 nas JAKs não está muito claro, embora em outras proteínas quinases ele exerça um papel fundamental para a afinidade da molécula com resíduos de fosfotirosina (CHEN et al., 1997; ZHOU et al., 2001; RADTKE et al., 2005; FUNAKOSHI-TAGO, 2008; HAAN et al., 2008; GHORESCHI, LAURENCE e O'SHEA, 2009). O domínio pseudoquinase precede o quinase e, devido à diferença de resíduos necessários para a atividade catalítica, ele não pode transferir fosfato e por isso é chamado de cataliticamente inativo (WILKS, 1991; YAMAOKA et al., 2004; GOLDMAN, 2005; KOTA, CACERES e CONSTANTINESCO, 2008). No entanto, o domínio pseudoquinase é estruturalmente necessário para a resposta das JAKs à ativação dos receptores de citocina e para a inibição basal da atividade do domínio quinase (YEH e PELLEGRINI, 1999; YEH et al., 2000; SAHARINEN e SILVENNOINEN, 2002). A mutação JAK2V617F ocorre no domínio pseudoquinase (Figura 1), o que resulta em uma ativação constitutiva do domínio quinase (KOTA, CACERES e CONSTANTINESCU, 2008).

Devido a esse fato, foi possível concluir que o domínio pseudoquinase é responsável por manter o domínio quinase inativo no estado basal (LINDAUER, 2001). Modelos moleculares do gene JAK2 sugerem que a mutação no domínio JH2 desestabiliza a conformação estrutural da proteína (IHLE e KERR, 1995; KAUSHANSKY, 2007), o que impede o efeito inibitório desse domínio sobre o JH1, levando à atividade quinase constitutiva característica das NMPCs (STAERK et al., 2005).

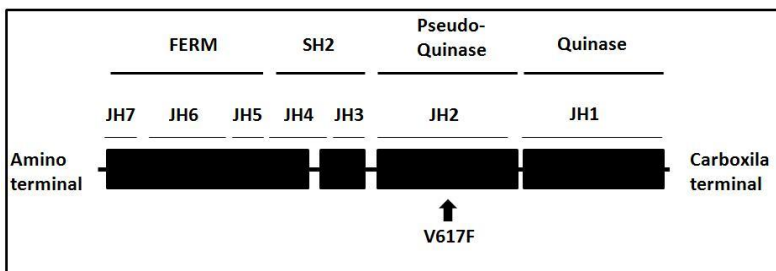


Figura 1. Representação esquemática do gene JAK2 mutado. Adaptado de RADTCKE et al., 2005.

1.4 Atividade quinase da proteína JAK2 e a mutação JAK2V617F

A proteína JAK2 é membro da família das tirosina quinases, que são enzimas capazes de catalisar a transferência de fosfato da molécula de ATP (adenosina trifosfato) para resíduos de tirosina presentes em seu próprio domínio citoplasmático (autofosforilação) e resíduos de tirosina de outras proteínas intracelulares (KRAUSE e ETEN, 2005; WALZ et al., 2006). Essas proteínas são componentes vitais para o mecanismo de sinalização relacionado a funções celulares essenciais, como a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência (WETZLER et al., 1993).

Em indivíduos saudáveis, a JAK2 funciona em associação com receptores que não possuem atividade quinase intrínseca. A ligação de citocina, de hormônios e de fatores de crescimento aos seus receptores específicos resulta em uma multimerização destes, cujos domínios citoplasmáticos estão associados com a JAK2 (KERR et al., 2003; SAHARINEN et al., 2003; TEFFERI e GILLILAND, 2005). Essa mudança conformacional resulta numa autofosforilação e ativação da proteína JAK2, que, conseqüentemente, atua na fosforilação do receptor

e no recrutamento e fosforilação de várias proteínas que atuam nas vias de sinalização celular, como ilustra a Figura 2. Portanto, a função da proteína JAK2 é agir como mediador entre o receptor de membrana e as moléculas de sinalização celular (GOLDMAN, 2005). Inclusive, alguns trabalhos demonstram que a JAK2 é a única *Janus kinase* responsável pela sinalização dos receptores de eritropoetina (EPO), uma vez que a deleção desse gene ocasiona letalidade embrionária devido à falta de eritropoiese (KERR et al., 2003; UGO et al., 2004), e progenitores hematopoiéticos deficientes de JAK2 não respondem a estímulos da EPO (GALM et al., 2003; LEVINE et al., 2007).

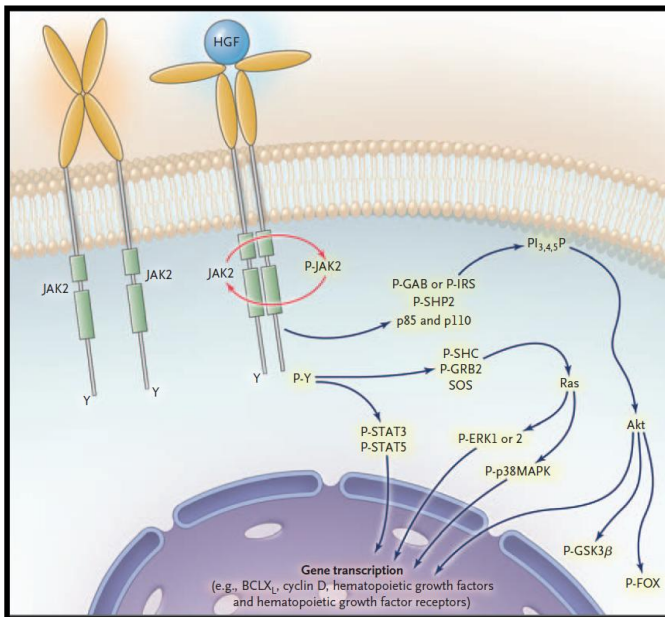


Figura 2. Representação das vias de sinalização ativadas pela proteína JAK2. O receptor de fator de crescimento hematopoético é composto por duas subunidades, as quais se ligam duas moléculas de JAK2. Esse receptor possui uma conformação aberta (esquerda) na ausência do fator de crescimento cognato. Na presença do ligante cognato ocorre uma mudança conformacional no receptor (direita). Essa mudança conformacional resulta numa autofosforilação e ativação da proteína JAK2, que, conseqüentemente, atua na fosforilação do receptor e no recrutamento e fosforilação de várias proteínas que atuam nas vias de sinalização celular. Adaptado de KAUSHANSKY et al., 2006.

A mutação JAK2V617F confere uma atividade quinase constitutiva à proteína. Sendo assim, esta permanece constantemente fosforilada (COOLS et al., 2003; ZHAO et al., 2005), o que leva à proliferação descontrolada de células hematopoiéticas, independentemente de citocinas. Tal evento é observado em colônias hematopoiéticas de pacientes com PV (PRCHAL e AXELRAD, 1974). Essa transformação mediada pela mutação JAK2V617F é mais eficiente em células hematopoiéticas que coexpressam o receptor de eritropoetina (EPOR), o receptor de trombopoetina (MPL) ou o receptor de fator estimulante de colônia de granulócitos (GCSFR). Diferentemente da maioria dos receptores de citocina, EPOR, MPL e GCSFR são receptores homodiméricos do tipo I, os quais são expressos nas células de linhagem eritrocítica, megacariocítica e granulocítica respectivamente. Assim, a predileção da mutação JAK2V617F por neoplasias proliferativas envolvendo essas três linhagens pode ser explicada, em parte, pela expressão diferencial desse tipo de receptor de citocina durante a diferenciação hematopoiética (LU et al., 2005).

Estudos *in vitro* demonstraram que a expressão da mutação JAK2V617F ativa múltiplas vias de sinalização, o que contribui para o processo de transformação neoplásica com o aumento da proliferação e inibição da apoptose. Entre as proteínas envolvidas nas vias de sinalização estão as proteínas ativadoras de transcrição e transdutoras de sinal (STATs), principalmente a STAT5, que, entre outras funções, regula positivamente a produção da proteína antiapoptótica Bcl-X1 (FUJINAKA et al., 2007). Após a ativação das STATs, ocorre a dimerização dessa proteína e a translocação para o núcleo celular, onde ela interage com domínios específicos do DNA, induzindo a transcrição do gene-alvo (KERR et al., 2003; SAHARINEN et al., 2003). Muitas evidências sugerem que a ativação constitutiva da STAT5 representa o principal motivo para o processo de transformação maligna que leva ao desenvolvimento de NMPCs (WERNIG et al., 2006; SCHWALLER et al., 1998; SCHWALLER et al., 2000). No entanto, a função-chave das STATs nesse processo de transformação ainda não está completamente elucidada (WALZ et al., 2008). Outras vias podem estar envolvidas, como, por exemplo, a PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), a mTOR (*mammalian target of rapamycin*), a MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e a AKT (*protein kinase B*), as quais já foram bem caracterizadas em modelos de leucemia (WALZ et al., 2006).

A ativação exacerbada das vias de sinalização provocada pela JAK2V617F pode, em parte, ser explicada pelo fato de que as células

com essa mutação conseguem escapar de um mecanismo de *feedback* negativo importante, que atenua a sinalização ocasionada pela proteína JAK2 (NICHOLSON et al., 1999; SASAKI et al., 2000). O principal mecanismo de regulação das JAKs é mediado por famílias de proteínas intracelulares, cuja principal função, justamente, é regular negativamente a transdução de sinal realizada por citocinas. Entre essas proteínas estão as supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) e as indutoras de citocinas contendo domínio SH2 (CIS) (JOHNSTON e O'SHEA, 2003; YOSHIMURA et al., 2007). As SOCS normalmente ligam-se às *JAKs kinases*, o que resulta na degradação das proteínas quinases. Em particular, as proteínas SOCS1 e SOCS3 são as responsáveis pela ligação à JAK2 e pela inibição de sua atividade catalítica. Embora a expressão da SOCS1 resulte em degradação da JAK2 e da JAK2V617F, o que leva à inibição da atividade quinase, a expressão da SOCS3, paradoxalmente, resulta em um aumento da estabilidade e atividade da proteína JAK2V617F (FRANTSVE et al., 2001; HOOKHAM et al., 2007), ou seja, a proteína JAK2 constitutivamente ativada pode dar origem à hiperfosforilação da proteína SOCS3, o que resulta no aumento da proliferação celular. Nesse caso, a SOCS3 age como um potencializador da sinalização mediada pela JAK2 (HOOKHAM et al., 2007).

Após a descoberta da mutação, tornou-se claro que essa anormalidade molecular poderia ser usada como marcador clonal para diagnóstico de NMPCs. Inicialmente, os resultados indicaram que a mutação JAK2V617F provavelmente seria específica de precursores da linhagem mieloide, uma vez que não era encontrada em linfócitos. Entretanto, com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, observou-se em alguns pacientes uma pequena fração de linfócitos e de células *natural killer* com a mutação JAK2V617F (BAXTER et al., 2005; JAMES et al., 2005; ; LASHO et al., 2005; DELHOMMEAU et al., 2006; LARSEN et al., 2007). Esses dados sugerem que as células adquirem a mutação em estágios iniciais da diferenciação, o que corrobora a hipótese de que as NMPCs são desordens originadas em células-tronco hematopoiéticas (ISHII et al., 2006).

1.5 Envolvimento da mutação JAK2V617F e as vias de apoptose

Como visto anteriormente, a mutação JAK2V617F ativa constitutivamente algumas vias de sinalização, como a da proliferação celular e da regulação da apoptose. Entre os fatores responsáveis pela

proliferação exacerbada, está a fosforilação das proteínas STAT3 e STAT5, caracterizadas pela regulação positiva de genes antiapoptóticos (KOTA, CACERES e CONSTANTINESCU, 2008; WALZ et al., 2008). Sabe-se que a STAT3 está constitutivamente ativa em muitas células tumorais humanas e que a sinalização aberrante desta proteína está envolvida no processo de progressão maligna. Entretanto, os mecanismos pelos quais a STAT3 contribui para a oncogênese não estão bem claros. Vários trabalhos relatam que a inibição da atividade da STAT3 resulta diretamente em uma redução da expressão da proteína antiapoptótica survivina (AOKI, FELDMAN e TOSATO 2003; JIANG et al., 2008; NIKITAKIS et al., 2009; ZHOU et al., 2009).

A homeostase de células normais em vários organismos é o resultado de um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada (apoptose). Ao contrário, as neoplasias são caracterizadas pelo aumento excessivo de células tumorais, devido a falhas entre um ou mais dos três processos referidos acima. A desordem de ambos os processos de apoptose ou de divisão celular representa um importante papel na tumorigênese. Os mecanismos que regulam a apoptose são complexos e consistem na ativação de numerosas sinalizações e de componentes inibitórios, que compõem vários sistemas paralelos ou interrelacionados, os quais culminam na autodestruição celular. Quando esses mecanismos são alterados, em favor da sobrevivência das células, eles contribuem para o desenvolvimento e a persistência do câncer (SHINOZAWA et al., 2000; CONTE et al., 2005). Por isso, o controle do sistema apoptótico tornou-se uma ferramenta terapêutica importante para eliminação de células neoplásicas (CONTE et al., 2005).

Alguns membros da família de proteínas inibidoras de apoptose (IAP) são expressos em certos cânceres humanos e, portanto, a remoção de seus efeitos inibitórios parece ser potencialmente útil na sensibilização das células neoplásicas para o efeito dos agentes anticâncer (DEVERAUX e REED, 1999). A survivina é membro da família de proteínas IAP, a qual apresenta influência no equilíbrio entre morte/viabilidade celular (AMBROSINI, ADIDA e ALTIERI, 1997) e está presente durante o desenvolvimento embrionário e fetal (ADIDA ET AL., 1998). Essa proteína não é detectada em tecidos adultos normais, no entanto, há superexpressão de survivina em vários tipos de neoplasias humanas (AMBROSINI, ADIDA e ALTIERI, 1997). Em 1998, Tamm e colaboradores demonstraram que a survivina suprime a apoptose induzida por Fas, Bax, caspases e fármacos anticâncer.

A survivina atua como reguladora positiva da fase G2/M, pois apresenta fundamental importância no aparato do fuso mitótico durante a citocinese e a separação cromossomal. As células embrionárias deficientes de survivina possuem alteração no tamanho e morfologia do núcleo, além de multinucleação, devido a defeitos na formação do fuso mitótico (SOMMER et al., 2003). A expressão desregulada da survivina promove mudanças na ploidia e, por isso, uma superexpressão dessa proteína em tumores malignos pode favorecer a progressão aberrante de células mutadas (INVERNIZZI et al., 2006). Embora o papel essencial da survivina na divisão celular já esteja bem elucidado, mesmo com vários experimentos evidenciados *in vitro* e em animais transgênicos *in vivo*, o mecanismo preciso pelo qual essa proteína inibe a apoptose permanece evasivo (DOHI et al., 2004).

O gene da survivina é reativo em tumores malignos e a superexpressão da proteína pode ser evidenciada por hibridização *in situ*, reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR), *western blotting* e imuno-histoquímica. Vários artigos mostram que pacientes com tumores nos quais as células expressam survivina possuem sobrevida menor, aumento da taxa de recorrência da doença e resistência à terapia (ALTIERI, 2004; CONTE et al., 2005; INVERNIZZI et al., 2006; NIKITAKIS, et al., 2009).

Alguns trabalhos mostram a importância da expressão da survivina em neoplasias humanas como alvo terapêutico no tratamento do câncer e como fator prognóstico. Xia e colaboradores (2002) demonstraram que a redução da expressão da survivina pode propiciar a morte celular por apoptose e a sensibilização de fármacos contra o tumor. Em células normais de cordão umbilical e em células tronco de medula óssea, ambas CD34+, a survivina é expressa em concentrações baixas. Entretanto, a expressão de níveis significantes dessa proteína pode ser observada em blastos mielóides e em linfócitos de algumas desordens linfoproliferativas. Isso sugere que a survivina tem papel importante no aumento da proliferação de células neoplásicas (INVERNIZZI et al., 2006).

Assim, considerando que a mutação JAK2V617F ativa constitutivamente a proteína transdutora de sinal STAT3, a qual está relacionada com a expressão da proteína antiapoptótica survivina e com o processo de progressão maligna, um dos objetivos desse trabalho foi avaliar se há associação da expressão da mutação JAK2V617F e da proteína antiapoptótica survivina em pacientes com suspeita de neoplasias mieloproliferativas.

1.6 Complexidade genética das NMPCs

Existem ainda algumas questões a serem elucidadas sobre as NMPCs. A principal delas, do ponto de vista patogênico, é esclarecer como uma única mutação pontual pode estar associada à patogênese de três doenças distintas: PV, TE e MFP. Algumas hipóteses são propostas para explicar as diferenças fenotípicas existentes entre elas (KILPIVAARA e LEVINE, 2008).

Existem, atualmente, duas hipóteses que explicam o papel da mutação JAK2V617F nas NMPCs (KRALOVICS et al., 2005; CAMPBELL e GREEN, 2006; KRALOVICS et al., 2006; IHLE e GILLILAND, 2007; LEVINE et al., 2007; KRALOVICS et al., 2008). De acordo com essas hipóteses, a mutação assume um papel primário ou secundário no desenvolvimento da doença. Na primeira hipótese, a mutação JAK2V617F, simultaneamente, induz a hematopoiese clonal e inicia o fenótipo mieloproliferativo. O desenvolvimento de cada uma das NMPCs é influenciado por fatores genéticos constitutivos de cada paciente. Já a segunda hipótese defende que outras mutações adquiridas antes da JAK2V617F são as responsáveis pelo desenvolvimento do clone hematopoiético anormal. Essas mutações, denominadas “pré-JAK2”, além de propiciar a aquisição da mutação JAK2V617F, determinam qual a NMPC que o indivíduo desenvolverá (PASSAMONTI e RUMI, 2009). Portanto, de acordo com esta hipótese, o desenvolvimento da mutação é um evento que ocorre durante a evolução clonal das NMPCs (Figura 3) (KRALOVICS, 2008). Alguns trabalhos apresentam dados que corroboram o modelo que sugere a presença de mutações prévias à JAK2V617F (KRALOVICS et al., 2006; RUMI et al., 2006; NUSSENZVEIG et al., 2007; WALZ et al., 2008). Sabe-se que algumas anormalidades citogenéticas, como a deleção do cromossomo 20q, são frequentemente observadas em pacientes com NMPC (KRALOVICS et al., 2006). Com base nesse fato, estudos avaliaram a presença de anormalidades citogenéticas em células de pacientes com NMPC e constataram que todas as células hematopoiéticas desses pacientes apresentavam a deleção do cromossomo 20q, enquanto apenas uma porção dessas células era positiva para a mutação JAK2V617F, comprovando o modelo de que a existência de uma mutação primária estabelece um perfil clonal que propicia a ocorrência da mutação no gene JAK2 (ASIMAKOPOULOS et al., 1994; KILPIVAARA e LEVINE, 2008). No entanto, existem dois

principais argumentos contra a hipótese de que a mutação é um evento secundário nas NMPCs. Primeiro, não existem relatos de pacientes identificados como sendo negativos para JAK2V617F no momento do diagnóstico e que tenham adquirido a mutação durante o curso da doença (LIPPERT et al., 2006). Segundo, em pesquisas com animais, a mutação JAK2V617F, por si só, é capaz de rapidamente desenvolver uma patologia semelhante à PV de humanos (JAMES et al., 2005; WERNIG et al., 2006; ZALESKAS et al., 2006).

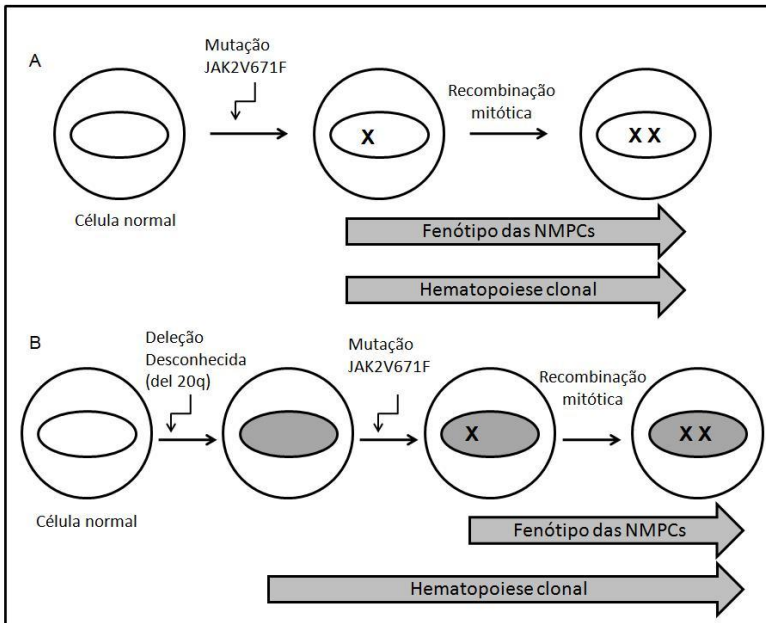


Figura 3. Representação das duas hipóteses sobre a patogênese das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR/ABL negativas. No modelo A, a mutação JAK2V617F (X) ocasiona a hematopoiese clonal e o fenôtipo das NMPCs BCR/ABL negativas ao mesmo tempo. No modelo B, a aquisição de uma mutação somática desconhecida ocasiona a hematopoiese clonal (exemplificada pela deleção do cromossomo 20q; del 20q, círculo cinza). A mutação JAK2V617F é adquirida posteriormente ao evento que causa a hematopoiese clonal, e neste momento ocorre o fenôtipo das NMPCs BCR/ABL negativas. Em alguns pacientes, a recombinação mitótica resulta na transição de células JAK2V617F heterocigóticas para células homocigóticas para a mutação (XX). Adaptado de KOTA et al., 2008.

Outro fato importante para o entendimento da patogênese das NMPCs foi relatado por Kralovics e colaboradores (2002). Esses pesquisadores verificaram que a perda da heterozigozidade (PH) do cromossomo 9p é um evento relativamente comum na PV. Nesse importante estudo, demonstrou-se que, diferentemente do que ocorre na maioria dos tumores em que a PH é comumente resultado de uma deleção da cópia não mutada do gene, na PV tal evento é resultado de uma dissomia uniparental adquirida (DUA) (KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005; LEVINE et al., 2007; KRALOVICS, GUAN e PRCHAL, 2002), na qual ocorre uma recombinação mitótica entre regiões homólogas dos cromossomos 9 heretozigóticos. Sabe-se que essa recombinação mitótica resulta na formação de cromossomos homozigóticos para a mutação, os quais possuem uma vantagem proliferativa adicional quando comparados aos heretozigóticos (Figura 4) (KRALOVICS et al., 2005).

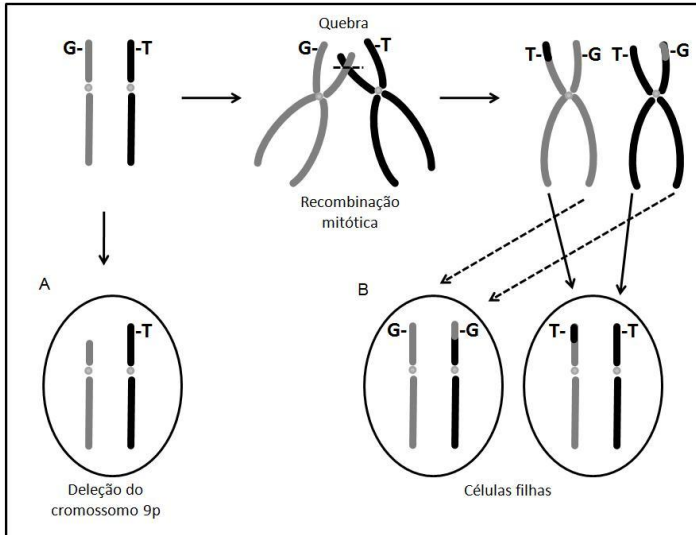


Figura 4. Representação dos mecanismos envolvidos na perda da heteroziguidade do cromossomo 9p. Nesta figura são apresentados dois modelos alternativos, A e B. O cromossomo 9 com a sequência selvagem do gene JAK2 (G) é representado pela cor cinza, e o cromossomo 9 com a mutação é representado pela cor preta (T). Os círculos simbolizam o núcleo celular. Em A, é demonstrado a deleção da parte telomérica do cromossomo 9p selvagem como um mecanismo provável para a perda da heteroziguidade do cromossomo 9p. Em B, é demonstrado que a recombinação mitótica também pode resultar na perda da heteroziguidade do cromossomo 9p. Os eventos que ocorrem durante a mitose e as células progenitoras resultantes da recombinação mitótica do cromossomo 9p também são mostrados na figura. Adaptado de KRALOVICS et al., 2005.

Como visto anteriormente, alguns estudos sobre a mutação JAK2V617F em linhagens celulares e em modelos animais comprovam seu perfil oncogênico, assim como o potencial de ocasionar NMPCs (JAMES et al., 2005; LACOUT et al., 2006; PIKMAN et al., 2006; WERNIG et al., 2006; SCOTT et al., 2007; SHIDE et al., 2008; TIEDT et al., 2008; XING et al., 2008). Esses trabalhos mostram que em

modelos de transplante de medula óssea e em ratos transgênicos a mutação JAK2V617F é capaz de induzir fenótipo mieloproliferativo, de maneira semelhante ao que acontece nas NMPCs humanas. No entanto, observou-se uma diferença na intensidade da indução de eritrocitose, leucocitose e fibrose medular em linhagens de ratos com e sem outras alterações genéticas presentes (WERNIG et al., 2006; ZALESKAS et al., 2006; VANNUCCHI et al., 2008). Essa observação revela que diferentes tipos de alterações genéticas podem modificar o fenótipo induzido pela JAK2V617F (CAMPBELL e GREEN, 2006; WERNIG et al., 2006; LEVINE et al., 2007; KRALOVICS et al., 2008; VANNUCCHI et al., 2008; PASSAMONTI e RUMI, 2009). Kralovics e colaboradores (2008) mostraram em experimentos com animais transgênicos que o nível de expressão da mutação JAK2V617F também interfere no fenótipo apresentado. Por exemplo, animais com baixa expressão da mutação desenvolveram trombocitemia, e os que apresentavam alta expressão desenvolveram policitemia (TIEDT et al., 2008). Como já mencionado, a homozigotidade para mutação JAK2V617F é o resultado de DUA no cromossomo 9p24. Alguns estudos demonstraram que essa homozigotidade é mais comum em PV do que em TE (CHEN et al., 1998; BAXTER et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005; SCOTT et al., 2006; DUPONT et al., 2007; HAFERLACH et al., 2008; KILPIVAARA et al., 2008). Com isso, pode-se supor que DUA no cromossomo 9p24 e a homozigotidade para a mutação JAK2V617F são comuns no desenvolvimento da PV, mas não na TE (BAXTER et al., 2005; JAMES et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005; SCOTT et al., 2006; SCOTT et al., 2007; SHIDE et al., 2008; VANNUCCHI et al., 2008). Estudos *in vivo* são consistentes com a hipótese de que a superexpressão da JAK2V617F nos compartimentos hematopoiéticos causa policitemia e leucocitose sem trombocitose associada (BUMM et al., 2006; LACOUT et al., 2006; WERNIG et al., 2006; ZALESKAS et al., 2006; KILPIVAARA et al., 2008) e que a baixa expressão dessa mutação está relacionada com a trombocitose (SCOTT et al., 2006; SHIDE et al., 2008; TIEDT et al., 2008; XING et al., 2008; PASSAMONTI e RUMI, 2009). Alguns trabalhos revelam a existência de uma predisposição familiar para o desenvolvimento das NMPCs, o que reforça a hipótese da presença de alelos que fornecem uma vantagem seletiva específica para o desenvolvimento da mutação (KRALOVICS, STOCKTON E PRCHAL, 2003; CARIO et al., 2005; BELLANNE-CHANTELOT et al., 2006). A NMPC familiar é caracterizada por uma herança

autossômica dominante, com penetração incompleta e presença variável das três NMPCs com características clínicas e moleculares indistinguíveis das NMPCs esporádicas (KRALOVICS, STOCKTON E PRCHAL, 2003; KRALOVICS e SKODA, 2005). Em todos os casos examinados, a mutação JAK2V617F é adquirida; nunca herdada através da linhagem germinal (BELLANNE-CHANTELOT et al., 2006; RUMI et al., 2006). A penetrância do fenótipo é dita incompleta, pois as mutações presentes na linhagem germinativa herdada não causam por si só NMPCs, que dependem da ocorrência da mutação somática do gene JAK2 (KRALOVICS, 2008; TIEDT et al., 2008).

Pardanani e colaboradores (2008) realizaram pesquisa sobre a influência fenotípica de polimorfismos de base única (SNPs) no gene JAK2. Nesse trabalho, foram analisados 32 SNPs em 179 pacientes com diferentes NMPCs. Verificou-se que polimorfismos de base única estavam associados com PV ou TE. Apesar de tratar-se de um único estudo, ele fornece evidências de que variações genéticas de cada indivíduo são relevantes para o fenótipo das NMPCs (PASSAMONTI e RUMI, 2009).

1.7 Diagnóstico laboratorial

Até recentemente, não havia nenhum exame laboratorial específico o diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa (SCHAFFER, 2006). Os critérios para o diagnóstico de PV foram amplamente modificados desde a padronização realizada pelo Grupo de Estudos em Policitemia Vera (PVSG), há mais de vinte anos (BERK et al., 1986; CAMPBELL e GREEN, 2006). Os testes preconizados eram caros e não estavam disponíveis universalmente. Além disso, os exames apresentavam baixa sensibilidade e especificidade. Entre essas análises estava a determinação da massa eritrocitária para distinguir eritrocitose verdadeira de policitemia relativa, identificação de crescimento de colônias eritroides independentes de eritropoetina *in vitro*, análise citogenética de células da medula óssea, verificação dos níveis de EPO, ultrassonografia do baço e teste da superexpressão de policitemia rubra vera 1 (PRV1) (TEFFERI e MURPHY, 2001; CAMPBELL e GREEN, 2005).

Atualmente, de acordo com a revisão dos critérios adotados para o diagnóstico das NMPCs, realizado pela OMS em 2008, a presença de mutação no gene JAK2 é considerada critério de maior importância para o diagnóstico de PV (LEVINE et al., 2007; SCOTT et al., 2007), e para

TE e na MFP representa um marcador clonal (TEFFERI et al., 2007; TEFFERI e VARDIMAN, 2008; PANANI, 2009). Além disso, a presença dessa mutação distingue a mieloproliferação clonal das NMPCs daquelas observadas na policitemia secundária, fibrose ou trombocitose reativas. A investigação da mutação JAK2V617F pode ser realizada por algumas metodologias, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (BAXTER et al., 2005; CAMPBELL et al., 2005; TEFFERI et al., 2005), PCR em tempo real (CAMPBELL et al., 2005), pirosequenciamento (JONES et al., 2005; SCOTT et al., 2006) e PCR com digestão enzimática (BAXTER et al., 2005; TEFFERI et al., 2005).

Na prática clínica, a pesquisa da mutação JAK2V617F é realizada como triagem em pacientes com nível de hemoglobina aumentado, trombocitose, neutrofilia, esplenomegalia de origem desconhecida e trombose de veia abdominal. Nesses casos, a detecção da mutação confirma a presença de NMPC, enquanto a ausência possui valor limitado para a realização do diagnóstico (CAMPBELL et al., 2005; LEVINE et al., 2006; TEFFERI, 2008).

As metodologias disponíveis para detecção da mutação no gene JAK2 são amplamente disponíveis e sensíveis o suficiente para detectar a presença de mutação heterozigótica em, no mínimo, 5% a 10% das células. Além disso, possuem baixos índices de resultados falso-positivos, o que faz desses ensaios ótimas ferramentas para uso diagnóstico (CAMPBELL e GREEN, 2006). No entanto, a possibilidade de resultados falso-positivos e falso-negativos não pode ser ignorada, principalmente levando-se em consideração a realização de testes alelo específicos altamente sensíveis e presença de pacientes com índices muito baixos de alelos mutados (menores que 5%) respectivamente (VERSTOVSEK et al., 2006; TEFFERI e VARDIMAN, 2008). Esses aspectos foram levados em consideração pela OMS na reformulação dos parâmetros adotados para o diagnóstico, no qual a análise histológica da medula óssea é considerada como critério necessário para o diagnóstico de TE, MFP e PV na ausência da mutação no gene JAK2. Além desse, outros parâmetros foram considerados como critérios de maior ou menor importância para o diagnóstico diferencial das NMPCs, como pode ser observado nos Quadros 1, 2 e 3 (TEFFERI et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a prevalência da mutação JAK2V617F em pacientes com diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa (Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária), referenciados ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) da Universidade Federal de Santa Catarina, no período de Janeiro de 2009 a Dezembro de 2010, e associar com a expressão da proteína antiapoptótica survivina como marcador diagnóstico.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar e implementar a reação em cadeia da polimerase alelo específico (AS-PCR) para a detecção da mutação JAK2V617F em amostras de sangue periférico de pacientes com suspeita clínica de NMPC BCR/ABL negativa na rotina do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias - LOEH, que atende os pacientes encaminhados ao Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Detectar a mutação JAK2V617F nas amostras de sangue periférico dos pacientes em investigação de NMPC BCR/ABL negativa, atendidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Associar a presença da mutação JAK2V617F com o subtipo de NMPC BCR/ABL negativa e com dados laboratoriais e clínicos dos pacientes (idade, gênero, contagem de hemácias, de leucócitos, e de plaquetas, concentração de hemoglobina, índice de hematócrito, e presença de eventos trombóticos e/ou esplenomegalia).
- Padronizar a reação de imuno-histoquímica para a investigação da expressão da proteína antiapoptótica survivina em biópsias de medula óssea.
- Analisar a expressão da proteína antiapoptótica survivina nas biópsias de medula óssea dos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa por imuno-histoquímica.
- Associar a presença da mutação JAK2V617F com a expressão da proteína antiapoptótica survivina em amostras de sangue periférico e biópsia de medula óssea, respectivamente.

- Avaliar a importância da detecção da mutação JAK2V617F e sua associação com a proteína antiapoptótica survivina como marcador de diagnóstico diferencial para as NMPCs BCR/ABL negativas.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Pacientes

3.1.1 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC (Protocolo de pesquisa n° 150/09) e do Centro de Pesquisas Oncológicas - CEPON (Protocolo de pesquisa n° 016/2010), e teve o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina - FAPESC (004/2009 – MS/CNPq/FAPESC/SES).

3.1.2 População do estudo

A investigação da mutação JAK2V617F foi realizada em 227 amostras com suspeita de NMPCs BCR-ABL negativas, encaminhadas ao LOEH, entre janeiro de 2009 e dezembro de 2010. Foram analisados 111 prontuários de pacientes com suspeita de NMPC. Desses, 54 pacientes obtiveram o diagnóstico de PV, TE ou MFP e, portanto, foram incluídos no estudo. A análise da proteína survivina foi realizada em 43 amostras com diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa que possuíam biópsia de medula óssea no arquivo do laboratório de anatomia patológica do HU ou do CEPON e em 25 amostras de medulas ósseas normais.

Todos os pacientes que participaram do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1), estavam cientes dos objetivos e das demais questões que envolviam a pesquisa e concordaram livremente em participar deste estudo. No caso de pacientes menores de 18 anos, a assinatura do TCLE (Anexo 1) foi realizada pelo responsável legal.

3.2 Métodos

3.2.1 Detecção da mutação JAK2V617F

3.2.1.1 Amostras

As amostras de SP incluídas neste estudo foram de pacientes encaminhados pelos médicos hematologistas, com suspeita clínica de NMPC BCR-ABL negativa, sem restrição de gênero ou idade. Utilizaram-se os seguintes parâmetros para delimitar a população a ser

analisada: (1) todos os pacientes encaminhados para pesquisa deveriam apresentar sinais e sintomas de NMPC BCR/ABL negativa; (2) a seleção das amostras deveria obedecer a todos os critérios exigidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa, portanto, foram excluídos do estudo os casos em que não foi possível obter TCLE.

Foram utilizadas, como controle negativo para a mutação, amostras ambulatoriais sem qualquer alteração hematológica. Para o controle positivo foi utilizada uma amostra de paciente conhecidamente positiva para a mutação. Como controle negativo para reação foi adicionada água ultrapura ao invés de DNA genômico de paciente.

3.2.1.2 Extração de DNA

O método empregado foi o de isotiocianato de guanidina não baseado em fenol. Além de possuir ação detergente, ocasionando a lise celular, o isotiocianato de guanidina atua na inativação de enzimas que interferem na PCR (GERSTEIN, 2001). A escolha desse método também levou em consideração a manipulação de reagentes menos tóxicos do que aqueles métodos baseados em fenol.

Para a realização da extração de DNA, uma alíquota de 200µL da amostra de SP do paciente foi adicionada a um microtubo estéril de 1,5mL (Axygen, CA, USA) contendo 1 mL de solução de extração de guanidina 5M (Invitrogen, CA, USA). A amostra foi homogeneizada por 15 segundos em *vortex* (Vortex Mixer, Vision Scientific Co.) e mantida sob agitação contínua *over night* em mesa agitadora orbital, em temperatura ambiente (20° a 25°C), para a lise das membranas celulares. Após a lise das células, foram adicionados 50 µL de solução de dióxido de sílica acidificada à mistura de sangue periférico e guanidina, que foi homogeneizada por inversão durante 2 minutos e submetida à centrifugação de 2.000 rpm por 1 min. em temperatura ambiente (20° a 25°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo sílica e DNA genômico foi lavado duas vezes com 500 µL de solução de lavagem de isotiocianato de guanidina 5M e novamente centrifugado a 2.000 rpm por 1 min. à temperatura ambiente. Após as lavagens com a solução de lavagem de isotiocianato de guanidina 5M, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% (p/p) (Merck, Darmstadt, Germany) e mais uma vez com acetona P.A (Merck, Darmstadt, Germany). Após a última lavagem, a sílica contendo DNA foi submetida a um processo de secagem em termobloco (Eppendorf), em temperatura de 56°C por 10

min. Após a secagem do sedimento, o DNA foi reidratado com 25 µL de Tampão Tris-EDTA [Tris (pH 6,4) 0,1M:EDTA (pH 8,0) 0,2m] (Invitrogen, CA, USA) e incubado a 56°C por 10 min. sob agitação de 900 rpm. Após a incubação, o tubo foi submetido à centrifugação, a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 0,2 mL (Axygen, CA, USA), tomando-se cuidado para não transferir juntamente o dióxido de sílica. A integridade do DNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% a 50 volts por 1 hora. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo 1% por 5 min. e visualizado em transiluminador (HOEFER-MacroVue UV-20) sob luz UV de 320 nm. Os DNAs foram armazenados em freezer, a uma temperatura de -20°C, até serem utilizados.

3.2.1.3. Reação em cadeia da polimerase alelo específica (AS-PCR)

Para a detecção da mutação JAK2V617F, foi realizada PCR alelo específica. Todos os reagentes utilizados nesta reação foram obtidos da (Invitrogen, CA, USA). Foram utilizadas sequências de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene JAK2 e para a mutação do gene (JAK2V617F), conforme descrito por Campbell e colaboradores (2006).

Quadro 4. Descrição das sequências de oligonucleotídeos utilizados

| <i>Primer</i> | <i>Sequência</i> |
|---------------|------------------------------------|
| JAK2 S | 5'AGCATTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT3' |
| JAK2 S/CI | 5'ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG3' |
| JAK2 R | 5'CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA3' |

Abreviações: S, sense; S/CI, *sense/control interno*; R, reverso. Adaptado de CAMPBELL et al.,2006.

Conforme mostra o Quadro 4, nesta PCR são utilizados 3 diferentes *primers*, denominados JAK2 S (*sense*), JAK2 S/CI (*sense/control interno*) e JAK2 R (reverso). O *primer* JAK2 S amplifica especificamente a região mutada do gene JAK2, enquanto o *primer* JAK2 S/CI amplifica uma região do gene JAK2 presente em todos os indivíduos, independente da presença ou não da mutação

JAK2V617F. Por sua vez, o JAK2 R é o *primer* reverso, ou *antisense*, comum aos dois primeiros *primers sense*. O produto de amplificação resultante dos *primers* JAK2 S - JAK2 R tem um tamanho de 203 pares de base (pb) e o seu produto indica a presença de mutação JAK2V617F. Já o produto de amplificação dos *primers* JAK2 S/CI - JAK2 R possui 364 pb, funciona com um controle interno e é encontrado em todas as amostras pesquisadas (Figura 5).

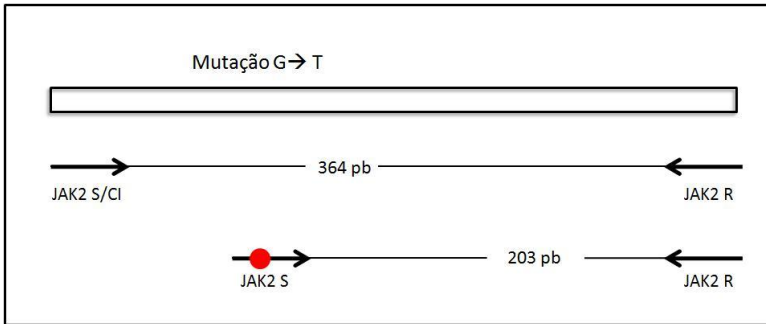


Figura 5. Representação da reação em cadeia da polimerase alelo específica para amplificação do gene JAK2 e JAK2V617F. Os *primers* JAK S/CI e JAK R amplificam um produto de 364 pb, independente da presença da mutação (controle interno). Os *primers* JAK2 S e JAK2 R amplificam, somente na presença da mutação, um produto de 203 pb. Abreviações: S, *sense*; S/CI, *sense*/controle interno; R, reverso.

A PCR foi realizada segundo Campbell et al. (2006), com algumas modificações, conforme descrito a seguir. A reação foi feita com um volume final de 50 μ L, utilizando-se: 2 μ L de DNA do paciente; 5,0 μ L de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20mM Tris-HCl, pH 8.4; 50mM KCl), 4,0 μ L de $MgCl_2$ (50 Mm), 0,6 de dNTP *mix* (100 mM de cada); 1,5 μ L do *primer* JAK2 S/CI (10 mM); 3,0 μ L do *primer* JAK2 S (5 mM); 5,0 μ L do *primer* JAK2 AS (10 mM); 0,6 μ L de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L); e água ultrapura q.s.p para 50 μ L.

As condições para PCR compreenderam um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C; 36 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C e 30 segundos a 72°C, e uma extensão final de 6 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram revelados em gel de agarose

1,5%, submetidos à eletroforese de 100 volts por 30 minutos, corados em solução de brometo de etídeo e visualizados em um transiluminador de luz UV de 320nm (HOEFER-MacroVue UV-20) e fotografados em um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT[®] Biosystems). O tamanho dos produtos foi estimado por comparação com um marcador de tamanho molecular de 50 pb (Invitrogen, CA, USA).

3.2.2 Detecção da proteína antiapoptótica survivina

3.2.2.1 Amostras

A pesquisa da proteína antiapoptótica survivina foi realizada em biópsia de medula óssea emblocada em parafina. Foram utilizados os seguintes parâmetros para delimitar a população a ser analisada: (1) ter realizado a análise da mutação JAK2V617F; (2) possuir diagnóstico, confirmado em prontuário, de NMPC BCR/ABL negativa; (3) ter feito biópsia de medula óssea; (4) ter assinado o TCLE. A obtenção das amostras de medula óssea foi feita por pesquisa no arquivo de blocos de parafina dos laboratórios de anatomia patológica do CEPON e do HU.

Como controle positivo da reação foram utilizados cortes histológicos de carcinoma de mama, que são conhecidamente positivos para proteína survivina (YAMAMOTO, NGAN e MONDEN, 2008) e como controle negativo da reação foram utilizadas amostras de biópsias de medula óssea sem alterações histológicas.

3.2.2.2 Reação de Imuno-histoquímica

As amostras de biópsia de medula óssea dos pacientes incluídos no estudo foram submetidas à reação de imuno-histoquímica para avaliação da expressão da proteína antiapoptótica survivina. Os blocos de parafina, com amostra dos pacientes processada histologicamente, foram cortados em micrótomo rotativo (LEICA, São Paulo, Brasil), obtendo-se cortes de 2 a 3 μ m de espessura, montados sobre lâminas silanadas (LEICA, São Paulo, Brasil). Após a fixação em estufa a 50° C por 1 hora, os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol com concentrações decrescentes e, por fim, em água. Após a hidratação dos cortes, bloqueou-se a peroxidase endógena, para evitar reações inespecíficas falso-positivas, com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto, em um banho de 20 min. Seguiu-se com lavagens em água destilada e tampão salina-

fosfato pH 7,2 (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM) (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil). Posteriormente, a amostra foi submetida à reativação antigênica em um tampão pH 6 à base de citrato (ácido cítrico 0,1 M e citrato de sódio 0,1 M) (Dako, Carpinteria, CA, USA), diluído 1:10 e mantido em banho-maria ajustado para 95°C – 98°C durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente (20°C – 25°C) durante 20 min. e lavadas com água destilada e tampão PBS. O Anticorpo monoclonal anti-survivina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, EUA) foi diluído a 1:25, em tampão Tris-HCl 0,05M. Após este procedimento, a solução contendo o anticorpo foi adicionada aos cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente, *over night*. As lâminas foram lavadas duas vezes com tampão PBS, por 5 min. cada, e foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-IgG/IgM (Dako Corporation, Carpinteria, USA), por 30 min. Logo após esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, USA), por mais 30 min. Posteriormente às lavagens, as amostras foram submetidas à revelação colorimétrica, com uma solução cromógena/substrato, contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina, previamente diluída em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de hidrogênio a 0,3% (Dako Cytomation, Carpinteria, USA). Após a revelação, foi feita a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, a desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol, a diafanização em xilol e a montagem em ENTELLAN® (MERCK, São Paulo, Brasil). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum (LEICA, São Paulo, Brasil), em aumento de 200X e 400X, sendo que todos os campos da lâmina foram analisados. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelo anticorpo (citoplasma celular).

3.3 Métodos estatísticos

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student não pareado. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.4 Análise dos prontuários

Para o estudo da associação dos resultados da investigação da mutação JAK2V617F e da proteína antiapoptótica survivina com os dados laboratoriais e clínicos dos pacientes, foi realizado um levantamento de dados nos prontuários dos pacientes incluídos no estudo. Os seguintes dados foram coletados: idade, gênero, contagem de eritrócitos, leucócitos, e plaquetas, índice de hematócrito e concentração de hemoglobina. Também foi observado se houve a presença de episódios trombóticos e/ou esplenomegalia. Os dados laboratoriais foram retirados dos exames com data correspondente ao início dos sinais e sintomas para NMPC, ou seja, antes do tratamento quimioterápico.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da metodologia para detecção da mutação JAK2V617F

4.1.1. Padronização da extração de DNA

Inicialmente, foi avaliada qual a melhor quantidade de amostra de SP que seria utilizada para a extração de DNA. Assim, foram utilizadas alíquotas de 100 μ L e 200 μ L de amostra de SP anticoagulado com EDTA (ácido etilenomino tetra-acético) de um grupo de indivíduos saudáveis, sem alterações hematológicas. O DNA das amostras foi extraído conforme protocolo descrito em Casuística e Métodos (item 3.2.1.2). As amostras extraídas tiveram sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose (Figura 6) e foram quantificadas utilizando-se QubitTM Quantitation Plataforma (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA).

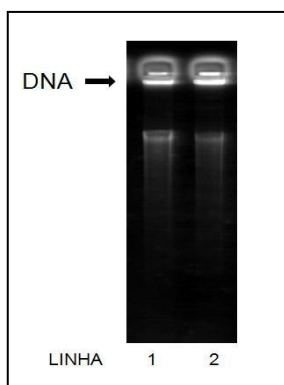


Figura 6. Gel de integridade de DNA. Linha 1 - 100 μ L de amostra. Linha 2- 200 μ L de amostra.

Como pode ser observado na Figura 6, levando em consideração a intensidade e degradação, as bandas de DNA genômico apresentaram o mesmo padrão de qualidade. De acordo com o método de quantificação, as amostras de 100 μ L e de 200 μ L apresentaram 63,5 micrograma/mL e 99,1 micrograma/mL de DNA, respectivamente. Sendo assim, optou-se pela utilização de 200 μ L de amostra de sangue periférico do paciente nas futuras extrações, devido à maior quantidade de DNA extraído.

4.1.2 Padronização da metodologia de AS-PCR

A PCR foi realizada segundo Campbell e colaboradores (2006), com algumas modificações, conforme descrito anteriormente em Casuística e Métodos (item 3.2.1.3).

Como pode ser observado na Figura 7, (linhas 2 e 3), as amostras dos indivíduos sem a mutação apresentam apenas uma banda de 364 pb, e foram utilizadas como controle interno da reação. Já na linha 4, a amostra do controle positivo para a mutação JAK2V617F apresenta duas bandas: a banda de 364 pb, descrita anteriormente, que é comum a todos indivíduos, e outra banda, de 203 pb, específica para o alelo mutado.

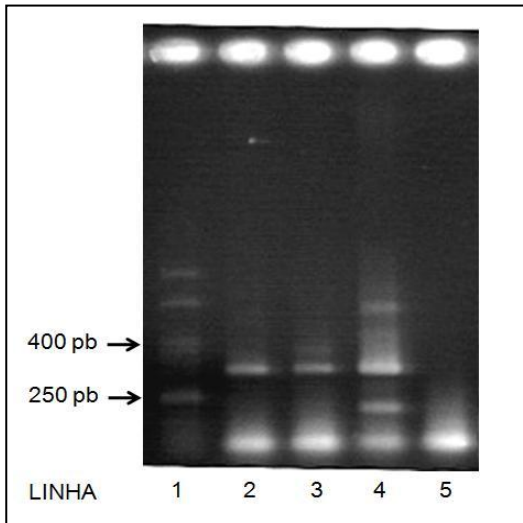


Figura 7. Gel apresentando a padronização da reação em cadeia da polimerase alelo específica. Linha 1- Marcador de tamanho molecular 50pb. Linhas 2 e 3- Amostras negativas para mutação JAK2V617F. Linha 4- Controle positivo para mutação JAK2V617F. Linha 5 - Controle negativo.

A fim de determinar as melhores condições eletroforéticas para visualização dos produtos obtidos com o AS-PCR, foi necessária a padronização das condições da eletroforese. Segundo o protocolo obtido da literatura (CAMPBELL et al., 2006), os produtos obtidos no AS-PCR

eram visualizados em gel de agarose 1,5%, submetido a 100 volts por 30 minutos. Porém, nessas condições, foram constatados dois problemas. O primeiro deles dizia respeito à diferença de 161 pb de tamanho entre os dois produtos, diferença esta que não foi suficientemente grande para uma separação bem definida das bandas. O outro problema consistiu no fato de que, algumas vezes, a banda correspondente à presença da mutação ficava quase na mesma altura da banda de sobras de *primers*, o que dificultava ou até impossibilitava sua visualização, como pode ser visto na Figura 8.

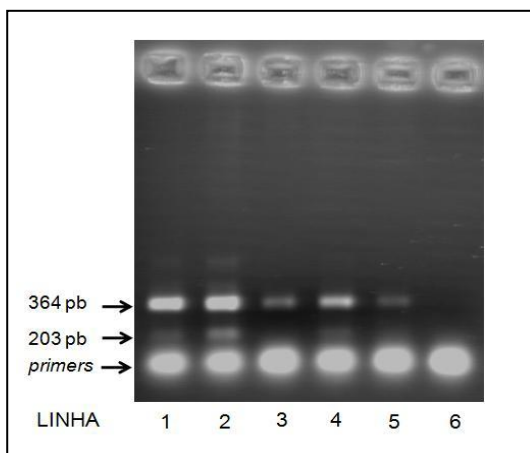


Figura 8. Gel de agarose 1,5%. Linhas 1, 2, 4 e 5 – presença de banda para mutação JAK2V617F. Linha 3 – ausência de banda para mutação JAK2V617F. Linha 6 – Controle negativo.

Assim, para solucionar o problema, decidiu-se aumentar a concentração do gel, diminuir a voltagem e aumentar o tempo da corrida eletroforética para que os fragmentos amplificados percorressem o gel mais lentamente e por um tempo maior. Depois de alguns testes, ficou determinado que as condições ideais para melhor visualização das bandas seriam: gel de agarose 2,5%, submetido a 80 volts, durante 40 minutos, como pode ser visualizado na Figura 9.

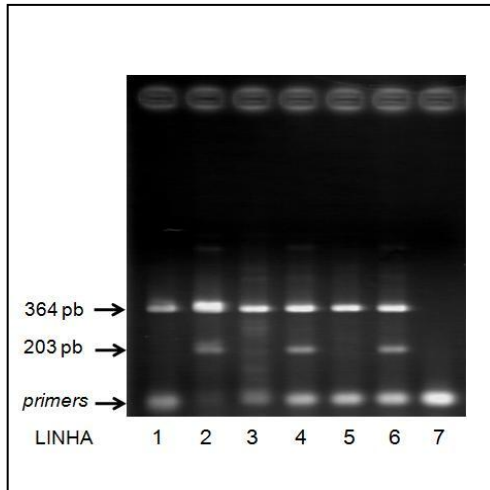


Figura 9. Gel de agarose 2,5%. Linhas 1, 3 e 5 – ausência de banda para mutação JAK2V617F. Linhas 2, 4 e 6 – presença de banda para mutação JAK2V617F. Linha 7 – Controle negativo.

4.2. Padronização da investigação da expressão da proteína survivina

4.2.1 Padronização da técnica de imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada conforme descrito em Casuística e Métodos (item 3.2.2.2) e, como controle positivo, foi utilizada uma amostra de biópsia de carcinoma de mama, que é conhecidamente positiva para proteína survivina (YAMAMOTO, NGAN e MONDEN, 2008). A marcação positiva para a expressão da proteína survivina nas células de carcinoma de mama é caracterizada pela coloração marrom no citoplasma celular, como pode ser visualizado na Figura 10.

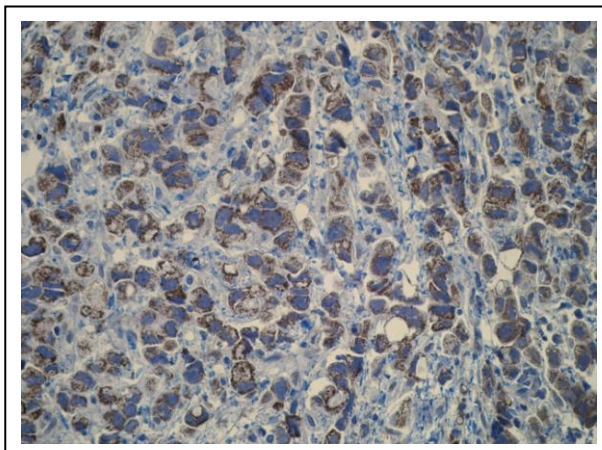


Figura 10. Marcação positiva para a proteína survivina pela técnica de imuno-histoquímica em corte histológico de carcinoma de mama. Aumento de 400 X mais *zoom* de 2 X.

A expressão da proteína survivina não foi detectada nas células estromais de amostras de medulas ósseas normais (utilizadas como controle negativo da reação), como pode ser visualizado na Figura 11.

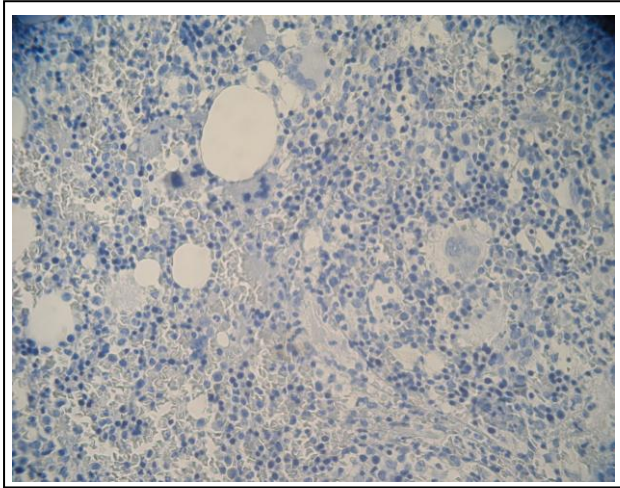


Figura 11. Marcação negativa para a proteína survivina pela técnica de imuno-histoquímica em corte histológico de medula óssea sem alterações. Aumento de 400 X.

4.3 Detecção da mutação JAK2V617F nas amostras de sangue periférico dos pacientes em investigação de NMPC BCR/ABL negativa

Durante o período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010, as amostras foram encaminhadas ao LOEH, que atende os pacientes encaminhados ao Serviço de Análises Clínicas do HU-UFSC. Das 227 amostras com suspeita clínica de NMPC BCR-ABL negativa encaminhadas para a investigação da mutação JAK2V617F, 54 pacientes obtiveram o diagnóstico de PV, TE ou MFP e, portanto, foram incluídos no estudo.

Do total de 54 casos incluídos no estudo, 32 casos (59,3%) apresentaram a mutação JAK2V617F e 22 casos (40,7%) não apresentaram a mutação.

Em relação ao gênero, 28 indivíduos eram mulheres e 26 eram homens. Entre as mulheres, 17 (60,7%) apresentaram a mutação JAK2V617F e 11 (39,3%) não apresentaram a mutação. Entre os

homens, 15 (57,7%) apresentaram a mutação JAK2V617F e 11 (42,3%) não apresentaram a mutação (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos casos com diagnóstico de NMPC BRC/ABL negativa que foram submetidos à investigação da mutação JAK2V617F, de acordo com o gênero

| Mutação JAK2V717F | | | |
|--------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Gênero | Negativo | Positivo | Total |
| Feminino | 11 (39,3%) | 17 (60,7%) | 28 |
| Masculino | 11 (42,3%) | 15 (57,7%) | 26 |
| Total | 22 (40,7%) | 32 (59,3%) | |

Abreviação: NMPC, neoplasia mieloproliferativa crônica.

A mediana de idade dos indivíduos com presença da mutação JAK2V617F foi de 61,5 anos, e a mediana de idade dos indivíduos negativos para a mutação foi de 52,5 anos. Como pode ser visto na Tabela 2, a mutação JAK2V617F mostrou-se mais frequente em indivíduos mais idosos, apresentando diferença estatística significativa ($P=0,014$) em relação aos indivíduos negativos para a mutação.

Tabela 2. Distribuição dos casos com diagnóstico de NMPC BRC/ABL negativa que foram submetidos à investigação da mutação JAK2V617F, de acordo com a idade

| Mutação JAK2V617F | Mediana da idade (anos) | Desvio Padrão | Idade mínima (anos) | Idade máxima (anos) | P |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------|
| Ausência | 52,5 | 13,9 | 19 | 74 | 0,014* |
| Presença | 61,5 | 16,9 | 33 | 89 | |

*Resultado estatisticamente significativo

Abreviação: NMPC, neoplasia mieloproliferativa crônica.

4.4 Associação da expressão da mutação JAK2V617F com a avaliação clínica, com os dados laboratoriais e com os subtipos de NMPCs BCR/ABL negativas

Estudos recentes descrevem a relação existente entre a presença da mutação JAK2V617F e a maior ocorrência de esplenomegalia e/ou de eventos trombóticos em pacientes com NMPC BCR/ABL negativa (CAMPBELL et al., 2005; WOLANSKY et al., 2005; PATRIARCA et al., 2010). Dos 54 casos incluídos no estudo, 11 (20,4%) apresentaram esplenomegalia (Tabela 3). Desses, 5 indivíduos (45,4%) apresentaram positividade para mutação. Dos 43 casos que não apresentaram esplenomegalia, 16 indivíduos (37,2%) eram negativos e 27 (62,8%) eram positivos para a mutação JAK2V617F. Em relação à presença de eventos trombóticos, como pode ser observado na Tabela 3, do total de 54 casos estudados, 7 (12,9%) apresentaram trombose. Desses, 6 indivíduos (85,7%) eram positivos para mutação JAK2V617F. No entanto, dos 47 casos que não apresentaram trombose, 21 indivíduos (44,7%) eram negativos e 26 (55,3%) eram positivos para mutação JAK2V617F. Conforme pode ser constatado na Tabela 3, não houve diferença estatística significativa entre os indivíduos com ausência ou com presença da mutação JAK2V617F e a maior ocorrência de esplenomegalia ($P=0,364$) e/ou eventos trombóticos ($P=0,147$).

Tabela 3. Frequência de esplenomegalia e/ou de trombose nos pacientes com diagnóstico de NMPC BRC/ABL negativa distribuídos de acordo com a presença ou ausência da mutação JAK2V617F.
Abreviação: NMPC, neoplasia mieloproliferativa crônica.

| | Dados Clínicos | Ausência da mutação | Presença da mutação | P |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|
| Indivíduos | Com esplenomegalia | 6 (54,5%) | 5 (45,4%) | 0,364 |
| | Sem esplenomegalia | 16 (37,2%) | 27 (62,8%) | |
| | Com trombose | 1 (14,3%) | 6 (85,7%) | 0,147 |
| | Sem trombose | 21 (44,7%) | 26 (55,3%) | |

Muitos estudos associam a presença da mutação JAK2V617F nos casos de NMPCs BRC/ABL negativas com concentrações altas de hemoglobina, índice de hematócrito aumentado e leucocitose (PANANI, 2009). De acordo com a Tabela 4, os valores médios dos eritrócitos dos pacientes com a presença e ausência da mutação JAK2V617F foi de $5,6 \times 10^6/\text{mm}^3$ e de $4,4 \times 10^6/\text{mm}^3$, respectivamente. A média da concentração de hemoglobina foi de 15,4 g/ml e de 13,2 g/ml nos pacientes positivos e negativos para mutação JAK2V617F, respectivamente. Os índices de hematócrito foram de 32% e 22% para os pacientes positivos e negativos para mutação JAK2V617F, respectivamente. Como pode ser observado na Tabela 4 a presença ou ausência da mutação JAK2V617F é estatisticamente significativa em relação aos valores de eritrócitos, de hemoglobina e de hematócrito. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada em relação ao número de leucócitos e de plaquetas dos indivíduos com e sem a mutação JAK2V617F.

Tabela 4: Valores médios da contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, índice de hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas, de acordo com a ausência ou a presença da mutação JAK2V617F.

| Valores Médios | Mutação JAK2V717F | | P |
|---|-----------------------|-----------------------|--------|
| | Negativo | Positivo | |
| Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3 \pm \text{DP}$) | 4,4 \pm 0,9 | 5,6 \pm 1,4 | 0,002* |
| Hemoglobina (g/ml \pm DP) | 13,2 \pm 3,0 | 15,4 \pm 3,1 | 0,015* |
| Hematócrito (% \pm DP) | 39,3 \pm 8,3 | 48,9 \pm 10,8 | 0,001* |
| Leucócitos (/mm ³ \pm DP) | 11.085 \pm 12.303 | 12.420 \pm 5018 | 0,598 |
| Plaquetas (/ μl \pm DP) | 647.095 \pm 477.149 | 696.094 \pm 312.493 | 0,680 |

*Resultado estatisticamente significativo

Conforme pode ser visualizado na Tabela 5, dos 54 indivíduos com diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa, 7 obtiveram o diagnóstico de MFP, 14 de PV e 33 de TE. A porcentagem da presença da mutação para cada subtipo de NMPC BCR/ABL negativa foi de 42,9% (3 casos) para MFP, 71,4% (10 casos) para PV e 57,6% (19 casos) para TE (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência dos subtipos de NMPCs BRC/ABL negativas de acordo com a presença ou ausência da mutação JAK2V617F.

| Subtipo da doença | Mutação JAK2V717F | | Total |
|-------------------|-------------------|------------|-------|
| | Negativo | Positivo | |
| MFP | 4 (57,1%) | 3 (42,9%) | 7 |
| PV | 4 (28,6%) | 10 (71,4%) | 14 |
| TE | 14 (42,4%) | 19 (57,6%) | 33 |
| Total | 22 | 32 | |

Abreviações: NMPC, neoplasia mieloproliferativa crônica; MFP, Mielofibrose primária; PV, Policitemia vera; TE, Trombocitemia Essencial.

A associação da presença ou da ausência da mutação JAK2V617F com outros parâmetros clínicos e laboratoriais (idade, contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, índice de hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas) foi analisada nos diferentes subtipos de NMPCs BCR/ABL negativas. Como pode ser observado na Tabela 6, nenhuma associação entre a presença ou ausência da mutação e os outros valores dos parâmetros analisados, nos indivíduos com MFP, foi estatisticamente significativa. Na PV a presença da mutação está associada a valores mais altos de eritrócitos ($P=0,031$) e plaquetas ($P=0,001$). Conforme pode ser observado na Tabela 6, os indivíduos com TE e positivos para mutação JAK2V617F possuem uma mediana de idade mais elevada (62 anos) do que os indivíduos com ausência de mutação (48,5 anos). A contagem de leucócitos também apresentou diferenças estatisticamente significativas ($P=0,009$) nos indivíduos com TE em relação à presença ou ausência da mutação JAK2V617F. Os indivíduos com TE e positivos para a mutação JAK2V617F apresentaram valores maiores de leucometria ($11.718 \times 10^9/l$) do que aqueles que não apresentam a mutação ($7.959 \times 10^9/l$).

Tabela 6. Valores médios de idade, contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, índice de hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas, de acordo com a ausência ou a presença da mutação JAK2V617F para cada subtipo de NMPC BCR/ABL negativa

| | Mutação JAK2V617F | | P |
|---|-------------------|-----------------|--------|
| | Negativo | Positivo | |
| MIELOFIBROSE PRIMÁRIA | | | |
| Idade, mediana ± intervalo (anos) | 65,0±(56-74) | 72,0±(69-74) | 0,199 |
| Eritrócitos, média ± DP ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | 3,5±1,0 | 5,1±0,9 | 0,229 |
| Hemoglobina, média ± DP (g/ml) | 9,3±1,7 | 15,4±4,3 | 0,118 |
| Hematócrito, média ± DP (%) | 28,9±4,9 | 48,9±13,3 | 0,108 |
| Leucócitos, média ± (/mm3) | 12.290±13.933 | 11.190±1.473 | 0,885 |
| Plaquetas, média ± (/µl) | 157.000±77.476 | 353.667±168.589 | 0,170 |
| POLICITEMIA VERA | | | |
| Idade, mediana ± intervalo (anos) | 49,5±(19-58) | 55,0±(34-77) | 0,339 |
| Eritrócitos, média ± DP ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | 5,8±0,2 | 6,9±1,1 | 0,031* |
| Hemoglobina, média ± DP (g/ml) | 18,0±1,2 | 18,4±2,5 | 0,746 |
| Hematócrito, média ± DP (%) | 52,5±2,6 | 56,7±5,7 | 0,111 |
| Leucócitos, média ± (/mm3) | 24.063±29.503 | 140.523±5.494 | 0,617 |
| Plaquetas, média ± (/µl) | 206.667±25.658 | 433.800±137.879 | 0,001* |
| TROMBOCITEMIA ESSENCIAL | | | |
| Idade, mediana ± intervalo (anos) | 48,5±(30-74) | 62,0±(33-89) | 0,008* |
| Eritrócitos, média ± DP ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | 4,2±0,5 | 4,9±1,2 | 0,072 |
| Hemoglobina, média ± DP (g/ml) | 13,3±1,6 | 13,9±2,1 | 0,374 |
| Hematócrito, média ± DP (%) | 39,5±4,7 | 44,7±10,7 | 0,073 |
| Leucócitos, média ± (/mm3) | 7.959±2.084 | 11.718±5.983 | 0,009* |
| Plaquetas, média ± (/µl) | 881.500±413.442 | 888.210±242.470 | 0,957 |

*Resultado estatisticamente significativo

Abreviação: NMPC, neoplasia mieloproliferativa crônica.

4.5 Análise da expressão da proteína antiapoptótica survivina nas biópsias de medula óssea e sua associação com a presença da mutação JAK2V617F nos pacientes com NMPCs BCR/ABL negativas

Das 43 amostras de biópsia de medula óssea incluídas no estudo para investigação da expressão da proteína survivina, 28 (65,1%) pertenciam a indivíduos positivos para mutação JAK2V617F e 15 (34,9%) pertenciam a indivíduos negativos para mutação JAK2V617F.

Apesar dos estudos relatarem vias de sinalização comum entre a mutação JAK2V617F e a expressão da proteína survivina (AOKI, FELDMAN e TOSATO, 2003; SOMMER et al., 2008; MITA et al., 2008), não foi observada marcação do anticorpo anti-survivina nas células das medulas ósseas dos pacientes com NMPCs BCR/ABL negativas, independente da presença ou não da mutação JAK2V617F. A ausência de coloração marrom no citoplasma das células, que seria característico da expressão da proteína survivina, pode ser visualizada na Figura 12.

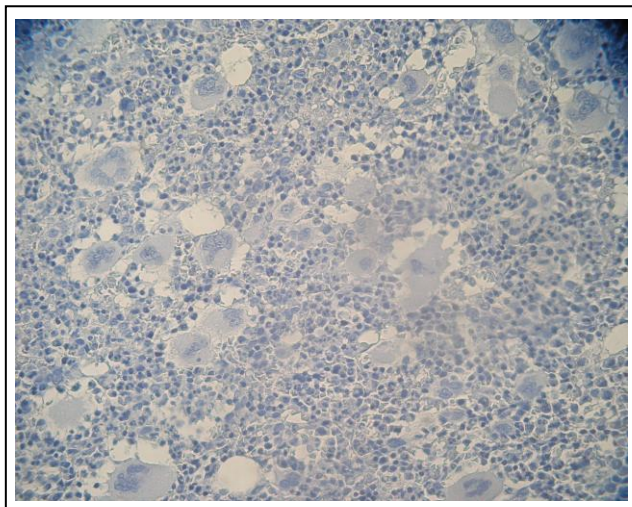


Figura 12. Marcação negativa para a proteína survivina pela técnica de imuno-histoquímica em corte histológico de medula óssea de paciente com NMPC BCR/ABL negativa. Aumento de 400X.

5 DISCUSSÃO

A descoberta da mutação JAK2V617F teve implicação direta no estabelecimento de novos protocolos para o diagnóstico e a classificação das NMPCs BCR/ABL negativas (CAMPBELL e GREEN, 2005; VAINCHENKER e CONSTANTINESCU, 2005). A genotipagem do gene JAK2 para os pacientes com MFP, PV e TE tornou-se um ensaio de utilidade clínica, por isso técnicas efetivas para a detecção da mutação JAK2V617F na rotina laboratorial estão sendo desenvolvidas e testadas (JAMES et al., 2006; MCCLURE, MAI e LASHO, 2006; MONTE-MÓR et al., 2007). Nesse trabalho, o achado de uma alta porcentagem de pacientes mutados (59,3%) reforça a importância da implementação dessa metodologia diagnóstica. Além disso, a pesquisa da mutação JAK2V617F não é realizada pelos laboratórios que atendem o SUS e a implementação dessa metodologia consolidada, no HU-UFSC, a interação da pesquisa com a assistência médica.

No presente estudo, os casos diagnosticados com NMPC BCR/ABL negativa e submetidos à pesquisa da mutação JAK2V617F foram distribuídos conforme o gênero, sendo que não foi observada diferença estatística significativa da presença da mutação entre homens (57,7) e mulheres (60,7%). Resultado similar foi descrito por Stein e colaboradores (2010) quando estes descreveram o gênero como fator independente da presença ou da ausência da mutação JAK2V617F. Outros estudos prévios também não observaram associação evidente entre o gênero e a presença da mutação JAK2V617F em grupos de pacientes com NMPCs BCR/ABL negativas (CAMPBELL et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; TEFFERI et al., 2005; BAROSI et al., 2007). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram achados anteriores que indicam que a presença da mutação JAK2V617F, nos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa, não está associada ao gênero.

Em relação à idade, os indivíduos positivos para a mutação JAK2V617F apresentaram uma mediana de idade maior (61,5 anos) do que indivíduos sem a mutação (52,5 anos). A maior porcentagem da mutação JAK2V617F em indivíduos mais idosos é condizente com alguns trabalhos da literatura, os quais afirmam que a mutação JAK2V617F é sempre adquirida, nunca herdada através da linhagem germinal (BELLANNE-CHANTELOT et al., 2006; RUMI et al., 2006). Neste trabalho, a mediana de idade encontrada nos indivíduos mutados (61,5 anos) foi semelhante à encontrada nos estudos de Campbell e colaboradores (2005) (60 anos), Kralovics e colaboradores (2005) (60 anos) e Kittur e colaboradores (2007) (62 anos).

Os eventos trombóticos são os maiores causadores de morbidade e de mortalidade nos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa e a decisão terapêutica para esses pacientes é baseada na presença ou ausência de trombose. Embora existam evidências clínicas que sugerem que a presença da mutação JAK2V617F pode estar variavelmente associada à trombose, a ocorrência de episódios trombóticos é atualmente questionável. (AUSTIN e LAMBERT, 2008). Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram que não há associação entre a presença da mutação JAK2V617F e a ocorrência de trombose, tendo em vista que esses eventos ocorreram em uma pequena porcentagem dos casos (12,9%) e que, mesmo nos casos em que não houve a ocorrência de trombose, a porcentagem da presença da mutação foi alta (55,3%). Os resultados da literatura relacionados a esse assunto são discrepantes: alguns estudos relatam uma associação direta da presença da mutação e a ocorrência de trombose (KRALOVICS et al., 2005; CERVANTES, PASSAMONTI e BAROSI, 2008; DE STEFANO et al., 2009) e outros descrevem resultados similares aos apresentados neste estudo (SAZAWAL et al., 2010; BAXTER et al., 2005; LEVINE et al., 2005; PATRIARCA et al., 2009). Kittur e colaboradores (2007) relatam que os resultados discrepantes reportados sobre a presença da mutação JAK2V617F e a presença de trombose ocorrem devido à falta de especificação do evento trombótico. A relação específica de trombose venosa, mas não de arterial, com a presença da mutação JAK2V617F já foi comprovada por Campbell e colaboradores (2005), e como em vários estudos a descrição dos eventos trombóticos não é subdividida, mas sim inclusa numa categoria geral, obviamente os resultados dos diversos estudos não serão coerentes.

Outra característica clínica dos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa é a ocorrência de esplenomegalia (CERVANTES, ARELLANO-RODRIGO E ALVAREZ-LARRÁN, 2009). Entretanto, esta característica parece estar mais relacionada à presença de grande quantidade de células mutadas do que à presença ou à ausência da mutação JAK2V617F. Os resultados publicados na literatura, que mostram a associação positiva entre a mutação JAK2V617F e a ocorrência de esplenomegalia, são todos de estudos que avaliam quantitativamente o número de células mutadas (BAROSI et al., 2007; KITTUR et al., 2007; VANNUCCHI et al., 2008). No presente estudo, não foi encontrada diferença estatística entre a presença ou a ausência da mutação JAK2V617F com a ocorrência de esplenomegalia. Esse resultado é condizente com os resultados dos vários trabalhos descritos

na literatura, em que, similarmente ao presente estudo, a avaliação da presença da mutação JAK2V617F foi realizada através de metodologia qualitativa (CAMPBELL et al., 2005; PUIGDECANET et al., 2008; SAZAWAL et al., 2010).

De acordo com protocolo da OMS, em 2008, para o diagnóstico das NMPCs BCR/ABL negativas, a presença da mutação JAK2V617F está entre os critérios de maior importância. Juntamente com a pesquisa da mutação JAK2V617F são analisados outros parâmetros laboratoriais para a realização do diagnóstico, como a concentração de hemoglobina, o índice de hematócrito, a contagem de eritrócitos e de plaquetas e a leucometria do sangue periférico (TEFFERI e VARDIMAN, 2008). Neste estudo, ao dividir os indivíduos de acordo com a presença ou ausência da mutação, foi observado que há associação entre a presença da mutação JAK2V617F e os valores mais elevados de eritrócitos, de hemoglobina e de hematócrito. Sazawal e colaboradores (2010) também encontraram uma associação entre os indivíduos positivos para a mutação JAK2V617F e valores mais altos de concentração de hemoglobina e leucometria. Como as NMPCs BCR/ABL negativas são subdivididas em três neoplasias (MFP, PV e TE) que, muitas vezes, apresentam diferentes parâmetros alterados entre si, a associação dos indivíduos positivos e negativos para a mutação JAK2V617F com os parâmetros supracitados será sempre muito variável.

Entre os três subtipos de NMPCs BCR/ABL negativas, a neoplasia mais comum é a PV, com uma incidência anual de aproximadamente 2 casos para cada 100.000 indivíduos (TAGARIELLO et al., 2009). Entretanto, neste estudo, a neoplasia de maior prevalência foi a TE, diagnosticada em 61,1% dos casos, seguida da PV, que foi diagnosticada em 26% dos casos. Como este estudo foi realizado em pacientes com NMPCs BCR/ABL negativas referenciados ao Hospital Universitário da UFSC (referência para neoplasias hematológicas/SUS/SC), esses resultados podem fornecer informações sobre a prevalência de cada subtipo de NMPC BCR/ABL negativa no estado de Santa Catarina.

Observa-se também a existência de variações consideráveis na frequência da mutação JAK2V617F nos diferentes subtipos de NMPCs BCR/ABL negativas reportadas nos estudos científicos. Essa frequência varia entre 35% e 57% para a MFP, 23% e 57% para a TE e 65% e 97% para a PV. No presente trabalho, os resultados da frequência da expressão da mutação JAK2V617F nos casos de MFP (42,9%), de TE (57,6%) e de PV (71,4%) estão de acordo com vários estudos

previamente descritos na (BAXTER et al., 2005; JAMES et al., 2005; LEVINE et al.; 2005). Com o objetivo de examinar os motivos da variação da frequência da presença da mutação JAK2V617F, Verstovsek e colaboradores (2006) revisaram alguns casos negativos para a mutação JAK2V617F em NMPCs BCR/ABL negativas, que foram publicados por três diferentes grupos de pesquisa. As possíveis razões encontradas que explicam essa discrepância foram: (1) diferenças na sensibilidade das metodologias empregadas; (2) falta de acurácia diagnóstica; e (3) eficácia do tratamento. A metodologia da AS-PCR, utilizada no presente estudo, foi descrita por Steensma e colaboradores (2006) como altamente sensível, capaz de detectar pequenas quantidades de células mutantes em meio à maioria de células normais. Além disso, Baxter e colaboradores (2005) realizaram um estudo comparativo entre as metodologias e encontraram frequências consideravelmente mais altas para a mutação JAK2V617F por AS-PCR do que pela técnica de sequenciamento de DNA. Porém, considerando-se que no presente trabalho também foram incluídos pacientes que já tinham diagnóstico anterior, a frequência da mutação JAK2V617F nos casos de NMPCs BCR/ABL negativas pode ter sido subestimada devido à supressão do clone mutante pelo tratamento.

Existem muitos trabalhos que avaliam a relevância da presença da mutação JAK2V617F no fenótipo das NMPCs BCR/ABL negativas. Em geral, a presença da mutação está relacionada ao aumento da concentração de hemoglobina, à idade avançada, ao aumento da leucometria e à diminuição da contagem de plaquetas (TEFFERI et al., 2008). Porém, quando a mutação JAK2V617F é associada separadamente a cada subtipo de NMPC BCR/ABL negativa, os parâmetros fenotípicos relacionados, em geral, não são os mesmos. Os resultados obtidos neste estudo mostram que a presença da mutação JAK2V617F não está associada à ocorrência de anormalidades laboratoriais nos indivíduos com MFP. Em um estudo recente, envolvendo 199 indivíduos com MFP, Tefferi e colaboradores (2008) também não encontraram associação significativa entre a presença da mutação JAK2V617F e os outros parâmetros laboratoriais alterados. Entretanto, Barosi e colaboradores (2007) descreveram em um estudo envolvendo 304 pacientes com MFP, que a presença da mutação JAK2V617F está associada com anormalidades laboratoriais, incluindo níveis aumentados de hemoglobina e de leucometria e contagem variável de plaquetas. Já os casos de PV e de TE positivos para a mutação JAK2V617F, incluídos neste estudo, tiveram aumento

significante na contagem de eritrócitos e de plaquetas e aumento na mediana de idade e leucometria, respectivamente. Esses resultados sugerem que há associação da mutação com a expansão da linhagem mielóide. Assim como os resultados deste estudo, vários outros trabalhos descrevem a associação da presença da mutação JAK2V617F com alguns parâmetros laboratoriais, mas não com outros (CAMPBELL et al., 2005; TEFFERI et al., 2006; CAMPBELL et al., 2006; VANNUCCHI et al., 2008; SAZAWAL et al., 2009). Entretanto, os parâmetros que não tiveram diferença significativa entre os grupos de pacientes positivos e negativos para a mutação JAK2V617F apresentaram variações interindividuais substanciais. Esses resultados sugerem que muitas manifestações clínicas são causadas por fatores não relacionados à mutação JAK2V617F, sendo que outras anormalidades adquiridas interferir com o fenótipo dessas neoplasias. Portanto, diferente da importância bem definida como valor diagnóstico, a relevância prognóstica da presença da mutação JAK2V617F nos casos de NMPCs BCR/ABL negativas permanece controversa.

Considerando as muitas evidências comprovando que a mutação JAK2V617F atua constitutivamente as vias de sinalização da STAT3 (KOTA et al., 2008; WALZ et al., 2008), e que isso acarreta a superexpressão da proteína survivina (MITA et al., 2008), um dos objetivos do presente estudo foi investigar a expressão dessa proteína nos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa e verificar se há associação com a expressão da mutação JAK2V617F. Como descrito anteriormente, a survivina possui um papel importante na inibição da apoptose, conferindo vantagem no crescimento e na sobrevivência das células tumorais, e por esse motivo tornou-se uma candidata interessante para a manipulação das vias apoptóticas (CONTE et al., 2005). Segundo alguns autores, a survivina é altamente expressa em doenças hematológicas malignas como, por exemplo, na leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide crônica e nos linfomas (ADIDA et al., 1998; SHINOZAWA et al., 2000; CARTER et al., 2001, CONTE et al., 2005). Entretanto, a expressão da proteína survivina não foi detectada nas medulas ósseas dos indivíduos deste estudo, independente da presença ou ausência da mutação JAK2V617F. Não foram encontrados estudos publicados na literatura avaliando a expressão da proteína survivina em pacientes com NMPC BCR/ABL negativa. Conte e colaboradores (2005) verificaram uma alta da expressão da proteína survivina nos casos de LMC. Além disso, os autores relatam a presença de uma associação dos níveis de expressão da

proteína quimérica BCR/ABL com os níveis de expressão da proteína survivina, sugerindo que a expressão da proteína survivina pode ser regulada pela proteína BCR/ABL nos casos de LMC. Neste estudo, não foi encontrada associação similar à do estudo de Conte e colaboradores entre a expressão da proteína survivina e a presença da mutação JAK2V617F, o que indica que a presença dessa mutação não influencia na expressão da survivina. Portanto, este resultado sugere que a investigação da expressão da proteína survivina em biópsia de medula óssea não serve como um bom marcador para o diagnóstico dos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- A extração de DNA a partir de 200 μL de amostra do paciente é mais eficiente do que a partir de 100 μL e é suficiente para a realização da AS-PCR.
- Para a melhor visualização dos produtos obtidos e correta interpretação da AS-PCR, as condições ideais para o fracionamento eletroforético são: gel de agarose 2,5%, submetido a 80 volts, durante 40 minutos.
- A diluição do anticorpo antissurvivina necessária para marcação da proteína na reação de imuno-histoquímica foi de 1:25, com incubação *over night*.
- A mutação JAK2V617F apresentou alta prevalência (59,3%) nos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa referenciados ao Hospital Universitário da UFSC.
- O subtipo de NMPC BCR/ABL negativa de maior prevalência nos pacientes referenciados ao Hospital Universitário da UFSC foi a TE (61,1%).
- Não houve diferença estatística significativa da presença da mutação JAK2V617F entre homens (57,7%) e mulheres (60,7%), sugerindo que a presença da mutação JAK2V617F nos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa não está associada ao gênero.
- Houve associação estatisticamente significativa entre a presença da mutação JAK2V617F e os indivíduos mais idosos, o que pode a caracterizar como adquirida.
- Não houve associação entre a presença da mutação JAK2V617F e eventos trombóticos de modo geral.
- Não houve associação entre a presença da mutação e a ocorrência de esplenomegalia.
- A presença da mutação JAK2V617F nem sempre está associada com a ocorrência de anormalidades laboratoriais (contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas, concentração de hemoglobina e índice de hematócrito) nos indivíduos com NMPC BCR/ABL negativa.
- A expressão da proteína survivina não foi detectada nas biópsias de medulas ósseas dos indivíduos deste estudo, portanto, a investigação da expressão da proteína survivina não serve como um bom marcador para o diagnóstico dos pacientes com NMPC BCR/ABL negativa.

A compilação de evidências obtidas nesse estudo permitiu constatar a importância da implementação de uma metodologia para detecção da mutação JAK2V617F para o diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa devido à alta prevalência dessa mutação nos pacientes deste estudo. E que, diferente da importância bem definida como valor diagnóstico, a relevância prognóstica da presença da mutação JAK2V617F, nos casos de NMPCs BCR/ABL negativas, permanece controversa.

7 REFERÊNCIAS

ADIDA, C.; CROTTY, P.L.; MCGRATH, J.; BERREBI, D.; DIEBOLD, J.; ALTIERI, D.C. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene surviving in human and mouse differentiation. **Am J Pathol**, v.52, n.1, p.43-9, 1998.

ALTIERI, D.C. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. **J Cell Biochem**, v.92, n.4, p.656-663, 2004.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D.C.; A novel anti-apoptosis gene survivin expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med**, v.3, n.8, p.917-21, 1997.

ANASTASI, J.; The myeloproliferative neoplasms: insights into molecular pathogenesis and changes in WHO classification and criteria for diagnosis. **Hematol Oncol Clin N Am**, v.23, n.4, p.693-708, 2009.

ANTONIOLI, E.; GUGLIELMELLI, P.; PANCRAZZI, A.; BOGANI, C.; VERRUCCI, M.; PONZIANI, V.; LONGO, G.; BOSI, A.; VANNUCCHI, A.M. Clinical implications of the JAK2V617F mutation in essential thrombocythemia. **Leukemia**, v.19, n.10, p.1847-9, 2005

ANTONIOLI, E.; GUGLIELMELLI, P.; BOGANI, C.; PANCRAZZI, A.; LONGO, G.; PONZIANI, V.; TOZZI, L.; PIERI, L.; SANTINI, V.; BOSI, A.; VANNUCCHI, A.M. Influence of JAK2 V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. **Haematologica**, v.93, n.1, p.41-8, 2008.

AOKI, Y.; FELDMAN, G.M.; TOSATO, G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases surviving expression in primary effusion lymphoma. **Blood**, v.101, n.4, p.1535-1542, 2003.

ASIMAKOPOULOS, F.A.; WHITE, N.J.; NACHEVA, E.; GREEN, A.R. Molecular analysis of chromosome 20q deletions associated with myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.84, n.9, p.3086-94, 1994.

AUSTIN, S.K.; LAMBERT, J.R. The JAK2V617F and thrombosis. **British Journal Haematology**, v.143, n.3, p.307-20, 2008.

AXELRAD, A.A.; ESKINAZI, D.; CORREA, P.N.; AMATO, D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. **Blood**, v.96 n.10, p.3310-21, 2000.

BAROSI, G.; BERGAMASCHI, G.; MARCHETTI, M.; VANNUCCHI, A.M.; GUGLIELMELLI, P.; ANTONIOLI, E.; MASSA, M.; ROSTI, V.; CAMPANELLI, R.; VILLANI, L.; VIARENGO, G.; GATTONI, E.; GERLI, G.; SPECCHIA, G.; TINELLI, C.; RAMBALDI, A.; BARBUI, T. JAK2V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. **Blood**, v.110, n.12, p.4030-6, 2007.

BAXTER, E.G.; SCOTT, L.M.; CAMPBELL, P.J.; EAST, C.; FOUROUCLAS, N.; SWANTON, S.; VASSILIOU, G.S.; BENCH, A.J.; BOYD, E.M.; CURTIN, N.; SCOTT, M.A.; ERBER, W.N.; GREEN, A.R. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v.365, n.9464, p.1054-61, 2005.

BELLANNE-CHANTELOT, C.; CHAUMAREL, I.; LABOPIN, M.; BELLANGER, F.; BARBU, V.; DE TOMA, C.; DELHOMMEAU, F.; CASADEVALL, N.; VAINCHENKER, W.; THOMAS, G.; NAJMAN, A. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. **Blood**, v.108, n.1, p.346-52, 2006.

BERK, P.D.; GOLDBERG, J.D.; DONOVAN, P.B.; FRUCHTMAN, S.M.; BERLIN, N.I.; WASSERMAN, L.R. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on polycythemia Vera Study Group protocols. **Semin Hematol**, v.23, n.2, p.132-43, 1986.

BERK, P.D.; GOLDBERG, J.D.; SILVERSTEIN, M.N.; WEINFELD, A.; DONOVAN, P.B.; ELLIS, J.T.; LANDAW, S.A.; LASZLO, J.; NAJEAN, Y.; PISCIOTTA, A.V.; WASSERMAN, L.R. In creased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. **N Engl J Med**, v.304, n.8, p.441-447, 1981.

BUMM, T.G.; ELSEA, C.; CORBIN, A.S.; LORIAUX, M.; SHERBENOU, D.; WOOD, L.; DEININGER, J.; SILVER, R.T.; DRUKER, B.J.; DEININGER, M.W. Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. **Cancer Res**, v.66, n.23, p.11156-65, 2006.

CAMPBELL, P.J.; GREEN, A.R. Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.201-8, 2005.

CAMPBELL, P.J.; GREEN, A.R. The myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v.355, n.23, p.2452-66, 2006.

CAMPBELL, P.J.; SCOTT, L.M.; BAXTER, E.J.; BENCH, A.J.; GREEN, A.R.; ERBER, W.N. Methods for the detection of the JAK2V617F mutation in human myeloproliferative disorders. **Methods Mol Med**, v.125, p.253-64, 2006.

CAMPBELL, P.J.; SCOTT, L.M.; BUCK, G.; WHEATLEY, K.; EAST, C.L.; MARSDEN, J.T.; DUFFY, A.; BOYD, E.M.; BENCH, A.J.; SCOTT, M.A.; VASSILIOU, G.S.; MILLIGAN, D.W.; SMITH, S.R.; ERBER, W.N.; BAREFORD, D.; WILKINS, B.S.; REILLY, J.T.; HARRISON, C.N.; GREEN, A.R. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. **Lancet**, v.366, n.9501, p.1945-53, 2005.

CAMPBELL, P.J.; GRIESSHAMMER, M.; DÖHNER, K.; DÖHNER, H.; KUSEC, R.; HASSELBALCH, H.C.; LARSEN, T.S.; PALLISGAARD, N.; GIRAUDIER, S.; LE BOUSSE-KERDILÈS, M.C.; DESTERKE, C.; GUERTON, B.; DUPRIEZ, B.; BORDESSOULE, D.; FENAUX, P.; KILADJIAN, J.J.; VIALARD, J.F.; BRIÈRE, J.; HARRISON, C.N.; GREEN, A.R.; REILLY, J.T. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. **Blood**, v.107, n.5, p.2098-100, 2006.

CARIO, H.; GOERTTLER, P.S.; STEIMLE, C.; LEVINE, R.L.; PAHL, H.L. The JAK2V617F mutation is acquired secondary to the predisposing alteration in familial polycythaemia vera. **Br J Haematol**, v.130, n.5, p.800-1, 2005.

CAROBBIO, A.; ANTONIOLI, E.; GUGLIEMELLI, P.; VANNUCCHI, A.M.; DELAINI, F.; GUERINI, V.; FINAZZI, G.; RAMBALDI, A.; BARBUI, T. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. **J Clin Oncol**, v.26, n.16, p.2732–6, 2008.

CAROBBIO, A.; FINAZZI, G.; GUERINI, V.; SPINELLI, O.; DELAINI, F.; MARCHIOLI, R.; BORRELLI, G.; RAMBALDI, A.; BARBUI, T. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors and JAK2 mutation status. **Blood**, v.109, n.6, p.2310–3, 2007.

CARTER, B.Z.; MILELLA, M.; ALTIERI, D.C.; ANDREEFF, M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. **Blood**, v.97, n.9, p.2784–90, 2001.

CERVANTES, F. Myelofibrosis: biology and treatment options. **Eur J Haematol Suppl**, v.68, p.13–7, 2007.

CERVANTES, F.; ARELLANO-RODRIGO, E.; ALVAREZ-LARRÁN, A. Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. **Haematologica**, v.94, n.11, p.1484–8, 2009.

CERVANTES, F.; PASSAMONTI, F.; BAROSI, G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. **Leukemia**, v.22, n.5, p.905–14, 2008.

CHEN, M.; CHENG, A.; CHEN, Y.; HYMEL, A.; HANSON, E.P.; KIMMEL, L.; MINAMI, Y.; TANIGUCHI, T.; CHANGELIAN, P.S.; O'SHEA, J.J. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.13, p.6910–5, 1997.

CHEN, Z.; NOTOHAMIPRODJO, M.; GUAN, X.Y.; PAIETTA, E.; BLACKWELL, S.; STOUT, K.; TURNER, A.; RICHKIND, K.; TRENT, J.M.; LAMB, A.; SANDBERG, A.A. Gain of 9p in the pathogenesis of polycythemia vera. **Genes Chromosomes Cancer**, v.22, n.4, p.321–4, 1998.

CONTE, E.; STAGNO, F.; GUGLIELMO, P.; SCUTO, A.; CONSOLI, C.; MESSINA, A. Survivin expression in chronic myeloid leukemia. **Cancer Lett**, v.225, n.1, p.105-110, 2005.

COOLS J, DEANGELO DJ, GOTLIB J, STOVER EH, LEGARE RD, CORTES J, KUTOK, J.; CLARK, J.; GALINSKY, I.; GRIFFIN, J.D.; CROSS, N.C.P.; TEFFERI, A.; MALONE, J.; ALAM, R.; SCHRIER, S.L.; SCHMID, J.; ROSE, M.; VANDENBERGHE, P.; VERHOEF, G.; BOOGAERTS, M.; WLODARSKA, I.; KANTARJIAN, H.; MARYNEN, P.; COUTRE, S.E.; STONE, R.; GILLILAND, D.G. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. **N. Engl. J. Med**, v.348, n.13, p.1201–14, 2003.

DE STEFANO, V.; ZA, T.; ROSSI, E.; FIORINI, A.; CIMINELLO, A.; LUZZI, C.; CHIUSOLO, P.; SICA, S.; LEONE, G. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. **Haematologica**, v.94, n.5, p.733-7, 2009.

DELHOMMEAU, F.; DUPONT, S.; TONETTI, C.; MASSE, A.; GODIN, I.; LE COUEDIC, J.P.; DEBILI, N.; SAULNIER, P.; CASADEVALL, N.; VAINCHENKER, W.; GIRAUDIER, S. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lympho-myeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. **Blood**, v.109, n.1, p.71–7, 2006.

DEVERAUX, O.L.; REED, J.C. IAP family proteins suppressors of apoptosis. **Genes Dev**, v.13, n.3, p.239-52, 1999.

DOHI, T.; BELTRAMI, E.; WALL, N.R.; PLESCIA, J.; ALTIERI, D.C. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. **J Clin Invest**, v.114, n.8, p.1117-27, 2004.

DUPONT ,S.; MASSE, A.; JAMES, C.; TEYSSANDIER, I.; LECLUSE, Y.; LARBRET, F.; UGO, V.; SAULNIER, P.; KOSCIELNY, S.; LE COUÉDIC, J.P.; CASADEVALL, N.; VAINCHENKER, W.; DELHOMMEAU, F. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. **Blood**, v.110, n.3, p.1013–21, 2007.

ELLIS, J.T.; PETERSON, P.; GELLER, S.A.; RAPPAPORT, H. Studies of the bone marrow in polycythemia vera and evolution of myelofibrosis and second hematologic malignancies. **Semin Hematol**, v.23, n.2, p.144-55, 1986.

ETIENNE, A.; GRUSON, B.; CHATELAIN, D.; GARIDI, R.; ROYER, B.; SEVESTRE, H.; MAROLLEAU, J.P.; DAMAJ, G. Myelofibrosis associated lymphoproliferative disease: retrospective study of 16 cases and literature review. **Adv Hematol**, 2009. *Impress*

FINAZZI, G.; BARBUI, T. Risk-adapted therapy in essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Blood Rev**, v.19, n.5, p.243-52, 2005.

FINAZZI, G.; RUGGERI, M.; RODEGHIERO, F.; BARBUI, T. Second malignancies in patients with essential thrombocythaemia treated with busulphan and hydroxyurea: long-term follow-up of a randomized clinical trial. **Br J Haematol**, v.110, n.3, p.577-83, 2000.

FRANTSVE, J.; SCHWALLER, J.; STERNBERG, D.W.; KUTOK, J.; GILLILAND, G. Socs- 1 inhibits TEL- JAK2- mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. **Mol. Cell Biol**. v.21, n.10, p.3547–57, 2001.

FUJINAKA, Y.; TAKANE, K.; YAMASHITA, H.; VASAVADA, R.C. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and BCL-XL upregulation. **J Biol Chem**, v.282, n.42, p.30707–17, 2007.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; PELLETIER, S.; MORITAKE, H.; PARGANAS, E.; IHLE, J.N. Jak2 FERM domain interaction with the erythropoietin receptor regulates Jak2 kinase activity. **Mol Cell Biol**, v.28, n.5, p.1792–801, 2008.

GALM, O.; YOSHIKAWA, H.; ESTELLER, M.; OSIEKA, R.; HERMAN, J.G. SOCS1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. **Blood**, v.101, n.7, p.2784–8, 2003.

GERSTEIN, A. S. **Molecular Biology. Problem Solver: A Laboratory Guide**. New York: Wiley Liss, 2001.

GHORESCHI, K.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J.J. Janus kinases in immune cell signaling. **Immunol Rev**, v.228, n.1, p.273-87, 2009.

GIRAULT, J.A.; LABESSE, G.; MORNON, J.P.; CALLEBAUT, I. The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. **Trends Biochem Sci**, v.24, n.2, p.54–7, 1999.

GITLER, A.D.; KONG, Y.; CHOI, J.K.; ZHU, Y.; PEAR, W.S.; EPSTEIN, J.A. Tie2-Cre-induced inactivation of a conditional mutant Nf1 allele in mouse results in a myeloproliferative disorder that models juvenile myelomonocytic leukemia. **Pediatr Res**, v.55, n.4, p.581-4, 2004.

GOLDMAN, J.M. A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v.352, n.17, p.1744-6, 2005.

GRUPPO ITALIANO STUDIO POLICITEMIA. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. **Ann Intern Med**, v.123, n.9, p.656-64, 1995.

HAAN, S.; MARGUE, C.; ENGRAND, A.; ROLVERING, C.; SCHMITZ-VAN DE LEUR, H.; HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; HAAN, C. Dual role of the Jak1 FERM and kinase domains in cytokine receptor binding and in stimulation-dependent Jak activation. **J Immunol**, v.180, n.2, p.998–1007, 2008.

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

HARPUR, A.G.; ANDRES, A.C.; ZIEMIECKI, A.; ASTON, R.R.; WILKS, A.F. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. **Oncogene**, v.7, n.7, p.1347-53, 1992.

HARRISON, C.N.; CAMPBELL, P.J.; BUCK, G.; WHEATLEY, K.; EAST, C.L.; BAREFORD, D.; WILKINS, B.S.; VAN DER WALT, J.D.; REILLY, J.T.; GRIGG, A.P.; REVELL, P.; WOODCOCK, B.E.; GREEN, A.R. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. **N Engl J Med**, v.353, n.1, p.33-45, 2005.

HELLER, P.G.; LEV, P.R.; SALIM, J.P.; KORNBLIHTT, L.I.; GOETTE, N.P.; CHAZARRETA, C.D.; GLEMBOTSKY, A.C.; VASSALLU P.S.; MARTA, R.F.; MOLINAS, F.C. JAK2V617F mutation in platelets from essential thrombocythemia patients: correlation with clinical features and analysis of STAT5 phosphorylation status. **Eur J Haematol**, v.77, n.3, p.210–6, 2006.

HOLLE, N.; DE WITTE, T.; MANDIGERS, C.; SCHAAP, N.; RAYMAKERS R. Thalidomide and lenalidomide in primary myelofibrosis. **Neth J Med**, v.68, n.1, p.293-8, 2010.

HOOKHAM, M.B.; ELLIOTT, J.; SUESSMUTH, Y.; STAERK, J.; WARD, A.C.; VAINCHENKER, W.; PERCY, M.J.; MCMULLIN, M.F.; CONSTANTINESCU, S.N.; JOHNSTON, J.A. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. **Blood**, v.109, n.11, p.4924–9, 2007.

HUANG, L.J.; CONSTANTINESCU, S.N.; LODISH, H.F. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. **Mol Cell**, v.8, n.6, p.1327–38, 2001.

IHLE, J.N.; GILLILAND, D.G. Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders. **Curr Opin Genet Dev**, v.17, n.1, p.8–14, 2007.

IHLE, J.N.; KERR, I.M. JAKs and STATs in signaling by the cytokine receptor super-family. **Trends Genet**, v.11, n.2, p.69-74, 1995.

INVERNIZZI, R.; TRAVAGLINO, E.; BENATTI, C.; MALCOVATI, L.; DELLA PORTA, M.; CAZZOLA, M.; ASCARI, E. Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia. **Eur J Haematol**, v.76, n.6, p.494-501, 2006.

ISHII, T.; BRUNO, E.; HOFFMAN, R.; XU, M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. **Blood**, v.108, n.9, p.3128–34, 2006.

JAMES, C.; DELHOMMEAU, F.; MARZAC, C.; TEYSSANDIER, I.; COUEDIC, J.P.; GIRAUDIER, S.; ROY, L.; SAULNIER, P.; LACROIX, L.; MAURY, S.; TULLIEZ, M.; VAINCHENKER, W.; UGO, V.; CASADEVALL, N. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. **Leukemia**, v.20, n.2, p.350-3, 2006.

JAMES, C.; UGO, V.; LE COUEDIC, J.P.; STAERK, J.; DELHOMMEAU, F.; LACOUT, C.; GARÇON, L.; RASLOVA, H.; BERGER, R.; BENNACEUR-GRISCELLI, A.; VILLEVAL, J.L.; CONSTANTINESCU, S.N.; CASADEVALL, N.; VAINCHENKER, W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v.434, n.7037, p.1144–8, 2005.

JIANG, H.; YU, J.; GUO, H.; SONG, H.; CHEN, S. Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.368, n.1, p.1-5, 2008.

JOHNSTON, J.A.; O'SHEA, J.J. Matching SOCS with function. **Nat Immunol**, v.4, n.6, p.507–9, 2003.

JONES, A.V.; KREIL, S.; ZOI, K.; WAGHORN, K.; CURTIS, C.; ZHANG, L.; SCORE, J.; SEEAR, R.; CHASE, A.J.; GRAND, F.H.; WHITE, H.; ZOI, C.; LOUKOPOULOS, D.; TERPOS, E.; VERVESSOU, E.C.; SCHULTHEIS, B.; EMIG, M.; ERNST, T.; LENGFELDER, E.; HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; OSCIER, D.; SILVER, R.T.; REITER, A.; CROSS, N.C. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. **Blood**, v.106, n.6, p.2162-8, 2005.

KAUSHANSKY, K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of JAK2: Dameshek's 54 year old speculation comes of age. **Best Pract Res Clin Haematol**, v.20, n.1, p.5-12, 2007.

KAUSHANSKY, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. **J Clin Invest**, v.115, n.12, p.3339-47, 2005.

KERR, I.M.; COSTA-PEREIRA, A.P.; LILLEMEIER, B.F.; STROBL, B. Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains. **FEBS Lett**, v.546, n.1, p.1-5, 2003.

KHWAJA, A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. **Br. J. Haematol**, v.134, n.4, p.366-84, 2006.

KILPIVAARA, O.; LEVINE, R.L. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. **Leukemia**, v.22, n.10, p.1813-7, 2008.

KITTUR, J.; KNUDSON, R.A.; LASHO, T.L.; FINKE, C.M.; GANGAT, N.; WOLANSKYJ, A.P.; LI, C.; WU, W.; KETTERLING, R.P.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. **Cancer**, v.109, n.11, p.2279-84, 2007.

KOTA, J.; CACERES, N.; CONSTANTINESCU, S.N. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v.22, n.10, p.1828-40, 2008.

KRALOVICS, R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v.22, n.10, p.1841-8, 2008.

KRALOVICS, R.; GUAN, Y.; PRCHAL, J.T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. **Exp. Hematol**, v.30, n.3, p.229-36, 2002.

KRALOVICS, R.; SKODA, R.C. Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. **Blood Rev**, v.19, n.1, p.1-13, 2005.

KRALOVICS, R.; STOCKTON, D.W.; PRCHAL, J.T. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. **Blood**, v.102, n.10, p.3793-6, 2003.

KRALOVICS, R.; TEO, S.S.; BUSER, A.S.; BRUTSCHE, M.; TIEDT, R.; TICHELLI, A.; PASSAMONTI, F.; PIETRA, D.; CAZZOLA, M.; SKODA, R.C. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. **Blood**, v.106, n.10, p.3374-6, 2005.

KRALOVICS, R.; TEO, S.S.; LI, S.; THEOCHARIDES, A.; BUSER, A.S.; TICHELLI, A.; SKODA, R.C. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. **Blood**, v.108, n.4, p.1377-80, 2006.

KRALOVICS, R.; PASSAMONTI, F.; BUSER, A.S.; TEO, S.; TIEDT, R.; PASSWEG, J.R.; TICHELLI, A.; CAZZOLA, M.; SKODA, R.C. A gain-of-function mutation of jak2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v.352, n.17, p.1779-90, 2005.

KRAUSE, D.S.; VAN ETTEN, R.A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. **N Engl J Med**, v.353, n.2, p.172-87, 2005.

LACOUT, C.; PISANI, D.F.; TULLIEZ, M.; GACHELIN, F.M.; VAINCHENKER, W.; VILLEVAL, J.L. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. **Blood**, v.108, n.5, p.1652-60, 2006.

LANDOLFI, R.; ROCCA, B.; PATRONO, C. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment. **Critical Rev Oncol Hematol**, v.20, n.3, p.203-22, 1995.

LARSEN, T.S.; CHRISTENSEN, J.H.; HASSELBALCH, H.C.; PALLISGAARD, N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. **Br J Haematol**, v.136, n.5, p.745-51, 2007.

LASHO, T.L.; MESA, R.; GILLILAND, D.G.; TEFFERI, A. Mutation studies in CD3+, CD19+ and CD34+ cell fractions in myeloproliferative disorders with homozygous JAK2(V617F) in granulocytes. **Br J Haematol**, v.130, n.5, p.797-9, 2005.

LEVINE, R.L.; BELISLE, C.; WADLEIGH, M.; ZAHRIEH, D.; LEE, S.; CHAGNON, P.; GILLILAND, D.G.; BUSQUE, L. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. **Blood**, v.107, n.10, p.4139-41, 2006.

LEVINE, R.L.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A.; GILLILAND, D.G. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nature**, v.7, n.9, p.676-83, 2007.

LEVINE, R.L.; WADLEIGH, M.; COOLS, J.; EBERT, B.L.; WERNIG, G.; HUNTLY, B.J.; BOGGON, T.J.; WLODARSKA, I.; CLARK, J.J.; MOORE, S.; ADELSPERGER, J.; KOO, S.; LEE, J.C.; GABRIEL, S.; MERCHER, T.; D'ANDREA, A.; FRÖHLING, S.; DÖHNER, K.; MARYNEN, P.; VANDENBERGHE, P.; MESA, R.A.; TEFFERI, A.; GRIFFIN, J.D.; ECK, M.J.; SELLERS, W.R.; MEYERSON, M.; GOLUB, T.R.; LEE, S.J.; GILLILAND, D.G. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v.7, n.4, p.387-97, 2005.

LINDAUER, K.; LOERTING, T.; LIEDL, K.R.; KROEMER, R.T. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. **Protein Eng**, v.14, n.1, p.27–37, 2001.

LIPPERT, E.; BOISSINOT, M.; KRALOVICS, R.; GIRODON, F.; DOBO, I.; PRALORAN, V.; BOIRET-DUPRE, N.; SKODA, R.C.; HERMOUET, S. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Blood**, v.108, n.6, p.1865–7, 2006.

LU, X.; LEVINE, R.; TONG, W.; WERNIG, G.; PIKMAN, Y.; ZARNEGAR, S. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617Fmediated transformation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, n.52, p.18962–7, 2005.

MA, A.C.; WARD, A.C.; LIANG, R.; LEUNG, A.Y. The role of jak2a in zebrafish hematopoiesis. **Blood**, v.110, n.6, p.1824–30, 2007.
MCCLURE, R.; MAI, M.; LASHO, T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. **Leukemia**, v.20, n.1, p.168-71, 2006.

MITA, A.C.; MITA, M.M.; NAWROCKI, S.T.; GILES, F.J. Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. **Clin Cancer Res**, v.14, n.16, p.5000-5, 2008.

MONTE-MÓR, B.C.R.; CUNHA, A.F.; PAGNANO, K.B.B.; SAAD, S.T.; LORAND-METZE, I.; COSTA, F.F. JAK2V617F prevalence In Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia. **Genet Mol Biol**, v.30, n.2, p.336-8, 2007.

NELSON, M.E.; STEENSMA, D.P. JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? **Leuk Lymphoma**, v.47, n.2, p.177–94, 2006.

NICHOLSON, S.E.; WILLSON, T.A.; FARLEY, A.; STARR, R.; ZHANG, J.G.; BACA, M.; ALEXANDER, W.S.; METCALF, D.; HILTON, D.T.; NICOLA, N.A. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. **EMBO J**, v.18, n.2, p.375–85, 1999.

NIKITAKIS, N.G.; SCHEPER, M.A.; PAPANIKOLAOU, V.S.; SAUK, J.J. The oncogenic effects of constitutive Stat3 signaling in salivary gland cancer cells are mediated by survivin and modulated by the NSAID sulindac. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.107, n.6, p.826-836, 2009.

NUSSENZVEIG, R.H.; SWIERCZEK, S.I.; JELINEK, J.; GAIKWAD, A.; LIU, E.; VERSTOVSEK, S.; PRCHAL, J.F.; PRCHAL, J.T. Polycythemia vera is not initiated by JAK2(V617F) mutation. **Exp Hematol**, v.35, n.1, p.32–8, 2007.

PANANI, A.D. Janus kinase 2 mutations in Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: Clinical implications. **Cancer Letters**, v.284, n.1, p.7-14, 2009.

PARDANANI, A.; FRIDLEY, B.L.; LASHO, T.L.; GILLILAND, D.G.; TEFFERI, A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. **Blood**, v.111, n.5, p.2785-9, 2008.

PARDANANI, A.D.; LEVINE, R.L.; LASHO, T.; PIKMAN, Y.; MESA, R.A.; WADLEIGH, M.; STEENSMA, D.P.; ELLIOTT, M.A.; WOLANSKYJ, A.P.; HOGAN, W.J.; MCCLURE, R.F.; LITZOW, M.R.; GILLILAND, D.G.; TEFFERI, A. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. **Blood**, v.108, n.10, p.3472–6, 2006.

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

PATRIARCA, A.; POMPETTI, F.; MALIZIA, R.; IULIANI, O.; MARZIO, I.; SPADANO, A.; DRAGANI, A. Is the absence of JAK2V617F mutation a risk factor for bleeding in essential thrombocythemia? An analysis of 106 patients. **Blood Transfus**, v.8, n.1, p.21-7, 2010.

PEARSON, T.C. The risk of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Semin Oncol**, v.29, n.3, p.16-21, 2002.

PIKMAN, Y.; LEE, B.H.; MERCHER, T.; MCDOWELL, E.; EBERT, B.L.; GOZO, M.; CUKER, A.; WERNIG, G.; MOORE, S.; GALINSKY, I.; DEANGELO, D.J.; CLARK, J.J.; LEE, S.J.; GOLUB, T.R.; WADLEIGH, M.; GILLILAND, D.G.; LEVINE, R.L. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLOS Med**, v.3, n.7, p.e270, 2006.

PRCHAL JF, AXELRAD AA. Bone-marrow responses in polycythemia vera. **N. Engl. J. Med**, v.290, n.24, p.1382, 1974.

PRCHAL, J.T. Classification and molecular biology of polycythemias (erythrocytoses) and thrombocytosis. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.17, n.5, p.1151-8, 2003.

PUIGDECANET E, ESPINET B, LOZANO JJ, SUMOY L, BELLOSILLO B, ARENILLAS L, ALVAREZ-LARRÁN A, SOLÉ F, SERRANO S, BESSES C, FLORENSA L. Gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocythemia. **Leukemia**, v.22, n.7, p.1368-76, 2008.

RADTKE, S.; HAAN, S.; JORISSEN, A.; HERMANN, H.M.; DIEFENBACH, S.; SMYCZEK, T.; SCHMITZ-VANDELEUR, H.; HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; HAAN, C. THE Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression. **J Biol Chem**, v.280, n.27, p.25760-8, 2005.

RADTKE, S.; HERMANNNS, H.M.; HAAN, C.; SCHMITZ-VAN DE LEUR, H.; GASCAN, H.; HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I. Novel role for Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. **J Biol Chem**, v.277, n.13, p.11297-305, 2002.

RAGIMBEAU J, DONDI E, ALCOVER A, EID P, UZE G, PELLEGRINI S. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. **EMBO J**, v.22, n.3, p.537-47, 2003.

REILLY, J.T.; SNOWDEN, J.A.; SPEARING, R.L.; FITZGERALD, P.M.; JONES, N.; WATMORE, A.; POTTER, A. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. **Br J Haematol**, v.98, n.1, p.96-102, 1997.

RODER S, STEIMLE C, MEINHARDT G, PAHL HL. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. **Exp Hematol**, v.29, n.6, p.694-702, 2001.

ROYER Y, STAERK J, COSTULEANU M, COURTOY PJ, CONSTANTINESCU SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. **J Biol Chem**, v.280, n.29, p.27251-61, 2005.

RUMI, E.; PASSAMONTI, F.; PIETRA, D.; DELLA PORTA, M.G.; ARCAINI, L.; BOGGI, S.; ELENA, C.; BOVERI, E.; PASCUTTO, C.; LAZZARINO, M.; CAZZOLA, M. JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. **Cancer**, v.107, n.9, p.2206-11, 2006.

SAHARINEN, P.; SILVENNOINEN, O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. **J Biol Chem**, v.277, n.49, p.47954-63, 2002.

SAHARINEN, P.; VIHINEN, M.; SILVENNOINEN, O. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. **Mol Biol Cell**, v.14, n.4, p.1448-59, 2003.

SASAKI A, YASUKAWA H, SHOUDA T, KITAMURA T, DIKIC I, YOSHIMURA A. CIS3/SOCS- 3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. **J Biol Chem**, v.275, n.38, p.29338–47, 2000.

SAZAWAL, S.; BAJAJ, J.; CHIKKARA, S.; JAIN, S.; BHARGAVA, R.; MAHAPATRA, M.; SAXENA, R.; Prevalence of JAK2V617F mutation in Indian patients with chronic myeloproliferative disorders. **Indian J Mes Res**, v.132, p.423-7, 2010.

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

SCHAFFER, A. Thrombocytosis. **N Engl J Med**, v.350, n.12, p.1211-9, 2004.

SCHWALLER, J.; FRANTSVE, J.; ASTER, J.; WILLIAMS, I.R.; TOMASSON, M.H.; ROSS, T.S.; PEETERS, P.; VAN ROMPAE, L.; VAN ETTEN, R.A.; ILARIA, R.; MARYNEN, P.; GILLILAND, D.G. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. **EMBO J**, v.17, n.18, p.5321–33, 1998.

SCHWALLER, J.; PARGANAS, E.; WANG, D.; CAIN, D.; ASTER, J.C.; WILLIAMS, I.R.; LEE, C.K.; GERTHNER, R.; KITAMURA, T.; FRANTSVE, J.; ANASTASIADOU, E.; LOH, M.L.; LEVY, D.E.; IHLE, J.N.; GILLILAND, D.G. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. **Mol Cell**, v.6, n.3, p.693–704, 2000.

SCOTT, L.M.; CAMPBELL, P.J.; BAXTER, E.J.; TODD, T.; STEPHENS, P.; EDKINS, S.; WOOSTER, R.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A.; GREEN, A.R. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. **Blood**, v.106, n.8, p.2920–1, 2005.

SCOTT, L.M.; SCOTT, M.A.; CAMPBELL, P.J.; GREEN, A.R. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. **Blood**, v.108, n.7, p.2435–7, 2006.

SCOTT, L.M.; TONG, W.; LEVINE, R.L.; SCOTT, M.A.; BEER, P.A.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A.; ERBER, W.N.; MCMULLIN, M.F.; HARRISON, C.N.; WARREN, A.J.; GILLILAND, D.G.; LODISH, H.F.; GREEN, A.R. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. **N Engl J Med**, v.356, n.5, p.459–68, 2007.

SHIDE, K.; SHIMODA, H.K.; KUMANO, T.; KARUBE, K.; KAMEDA, T.; TAKENAKA, K.; OKU, S.; ABE, H.; KATAYOSE, K.S.; KUBUKI, Y.; KUSUMOTO, K.; HASUIKE, S.; TAHARA, Y.; NAGATA, K.; MATSUDA, T.; OHSHIMA, K.; HARADA, M.; SHIMODA, K. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. **Leukemia**, v.22, n.1, p.87–95, 2008.

SHINOZAWA, I.; INOKUCHI, K.; WAKABAYASHI, I.; DAN, K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, Survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. **Leuk Res**, v.24, n.11, p.965–970, 2000.

SIRHAN, S.; LASHO, T.L.; HANSON, C.A.; MESA, R.A.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A. The presence of JAK2V617F in primary myelofibrosis or its allele burden in polycythemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. **Am. J. Hematol**, v.83, n.5, p.363–5, 2008

SOMMER, K.W.; SCHAMBERGER, C.J.; SCHMIDT, G.E.; SASGARY, S.; CERNI, C. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. **Oncogene**, v.22, n.27, p.4266–80, 2003.

STAERK J., KALLIN A., DEMOULIN J.B., VAINCHENKER W., CONSTANTINESCU S.N. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. **J Biol Chem**, v.280, n.51, p.41893–9, 2005.

STEENSMA, D.P. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a from the 2005 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn*, v.8, n.4, p.397-411, 2006.

STEENSMA, D.P.; DEWALD, G.W.; LASHO, T.L.; POWELL, H.L.; MCCLURE, R.F.; LEVINE, R.L.; GILLILAND, D.G.; TEFFERI, A. The JAK2 V617F Activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. **Blood**, v.106, n.4, p.1207-9, 2005.

STEIN, B.L.; WILLIAMS, D.M.; WANG, N.Y.; ROGERS, O.; ISAACS, M.A.; PEMMARAJU, N.; SPIVAK, J.L.; MOLITERNO, A.R. Sex differences in the JAK2V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. **Haematol**, v.95, n.7, p.1090-7, 2010.

TAGARIELLO, G.; GAETANO, R.; SARTORI, R.; ZANOTTO, D.; BELVINI, D.; RADOSSI, P.; RISATO, R.; ROVERONI, G.; SALVIATO, R.; TASSINARI, C.; TOFFANO, C. The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in blood donors with upper-limit haematocrit levels. *Blood Transfus*, v.7, n.2, p.111-6, 2009.

TAMM, I.; WANG, I.; SAUSVILLE, E.; SCUDIERO, D.A.; VIGNA, N.; OLTERSODORF, T. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Res**, v.58, n.23, p.5315-20, 1998.

TEFFERI, A. JAK and MPL mutations in myeloid malignancies. *Leukemia Lymphoma*, v.49, n.3, p.388-97, 2008.

TEFFERI, A. JAK2 mutations and clinical practice in myeloproliferative neoplasms. **Cancer J**, v.13, n.6, p.366-71, 2007.

TEFFERI, A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. **N Engl J Med**, v.342, n.17, p.1255-65, 2000.

TEFFERI, A. Polycythemia vera: a comprehensive review and clinical recommendations. **Mayo Clin Proc**, v.78, p.174-94, 2003.

TEFFERI, A.; ELLIOTT, M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: Prevalence, prognostic factors and the role of leucocytes and JAK2V617F. **Semin. Thromb. Hemost**, v.33, n.4, p.313–20, 2007.

TEFFERI, A.; GILLILAND, D.G. Jak2 in myeloproliferative disorders is not just another kinase. **Cell Cycle**, v.4, n.8, p.1053-56, 2005.

TEFFERI, A.; GILLILAND, D.G. Oncogenes in myeloproliferative disorders. **Cell Cycle**, v.6, n.5, p.550–66, 2007.

TEFFERI, A.; LASHO, T.L.; SCHWAGER, S.M.; STEENSMA, D.P.; MESA, R.A.; LI, C.Y.; WADLEIGH, M.; GARY GILLILAND, D. The JAK2 tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. **Br J Haematol**, v.131, n.3, p.320–8, 2005.

TEFFERI, A.; LASHO, T.L.; SCHWAGER, S.M.; STRAND, J.S.; ELLIOTT, M.; MESA, R.; LI, C.; WADLEIGH, M.; LEE, S.J.; GILLILAND, D.G. The Clinical phenotype of wild-type, heterozygous, end homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. **Cancer**, v.106, n.3, p.631-5, 2006.

TEFFERI, A.; MURPHY, S. Current opinion in essential thrombocythemia: pathogenesis, diagnosis, and management. **Blood**, v.15, n.3, p.121-31, 2001.

TEFFERI, A.; STRAND, L.L.; LASHO, T.L.; KNUDSON, R.A.; FINKE, C.M.; GANGAT, N.; PARDANANI, A.; HANSON, C.A.; KETTERLING, R.P. Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera, **Leukemia**, v.21, n.9, p.2074–5, 2007.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 world health organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia**, v.22, n.1, p.14-22, 2008.

TEFFERI, A.; LASHO, T.L.; HUANG, J.; FINKE, C.; MESA, R.A.; LI, C.Y.; WU, W.; HANSON, C.A.; PARDANANI, A. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia free survival, **Leukemia**, v.22, n.4, p.756–61, 2008.

TEFFERI, J.; THIELE, A.; ORAZI, H.M.; KVASNICKA, T.; BARBUI, C.A.; HANSON, C.A.; BAROSI, G.; VERSTOVSEK, S.; BIRGEGARD, G.; MESA, R.; REILLY, J.T.; GISSLINGER, H.; VANNUCCHI, A.M.; CERVANTES, F.; FINAZZI, G.; HOFFMAN, R.; GILLILAND, D.G.; BLOOMFIELD, C.D., VARDIMAN, J.W. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis: recombinations from an ad hoc international expert panel, **Blood**, v.110, n.4, p.1092–7, 2007.

THIELE, J.; KVASNICKA, H.M.; ORAZI, A.; TEFFERI, A.; BRIGEGARD, G. Polycythaemia vera. In: SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.M. (Eds.). **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC, 2008. p.40-3.

THIELE, J.; KVASNICKA, H.M.; ORAZI, A.; TEFFERI, A.; BRIGEGARD, G. Polycythaemia vera. In: SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.M. (Eds.). **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC, 2008. p.40-3.

THIELE, J.; KVASNICKA, H.M.; TEFFERI, A.; BAROSI, G.; ORAZI, A.; VARDIMAN, J.W. Primary myelofibrosis. In: SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.M. (Eds.). **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC, 2008. p.44-7.

TIEDT, R.; HAO-SHEN, H.; SOBAS, M.A.; LOOSER, R.; DIRNHOFER, S.; SCHWALLER, J.; SKODA, R.C. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. **Blood**, v.111, n.8, p.3931–40, 2008.

UGO, V.; MARZAC, C.; TEYSSANDIER, I.; LARBRET, F.; LECLUSE, Y.; DEBILI, N.; VAINCHENKER, W.; CASADEVALL, N. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. **Exp Hematol**, v.32, n.2, p.179-87, 2004.

VAINCHENKER, W.; CONSTANTINESCU, S.N. A unique activating mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of Myeloproliferative diseases. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)**, n.1, p.195-200, 2005.

VANNUCCHI, A.M.; ANTONIOLI, E.; GUGLIEMELLI, P.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. **Leukemia**, v.22, n.7, p.1299-1307, 2008.

VANNUCCHI, A.M.; ANTONIOLI, E.; GUGLIEMELLI, P.; LONGO, G.; PANCRAZZI, A.; PONZIANI, V.; BOGANI, C.; FERRINI, P.R.; RAMBALDI, A.; GUERINI, V.; BOSI, A.; BARBUI, T. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2V617F allele burden. **Leukemia**, v.21, n.9, p.1952–9, 2007.

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

VARRICHIO, L.; MANCINI, A.; MIGLIACCIO A.R. Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis. **Expert Rev Hematol**, v.2, n.1, p.315-34, 2009.

VERSTOVSEK, S.; SILVER, R.T.; CROSS, N.C.; TEFFERI, A. JAK2V617F mutational frequency in polycythemia vera: 100%, >90%, less? **Leukemia**, v.20, n.11, p.2067, 2006.

VIZMANOS, J.L.; ORMAZABAL, C.; LARRAYOZ, M.J.; CROSS, N.C.; CALASANZ, M.J. JAK2 V617F mutation in classic chronic myeloproliferative diseases: a report on a series of 349 patients. **Leukemia**, v.20, n.3, p.534–5, 2006.

WALZ, C.; CROSS, N.C.; VAN ETTEN, R.A.; REITER, A. Comparison of mutated ABL1 and JAK2 as oncogenes and drug targets in myeloproliferative disorders. **Leukemia**, v.22, n.7, p.1320-34, 2008.

WALZ, C.; CROWLEY, B.J.; HUDON, H.E.; GRAMLICH, J.L.; NEUBERG, D.S.; PODAR, K.; GRIFFIN, J.D.; SATTLER, M. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. **J Biol Chem**, v.281, n.26, p.18177–83, 2006.

WERNIG, G.; MERCHER, T.; OKABE, R.; LEVINE, R.L.; LEE, B.H.; GILLILAND, D.G. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. **Blood**, v.107, n.11, p.4274–81, 2006.

WETZLER, M.; TALPAZ, M.; VAN ETTEN, R.A.; HIRSH-GINSBERG, C.; BERAN, M.; KURZROCK, R. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. **J Clin Invest**, v.92, n.4, p.1925–39, 1993.

WILKS, A.F.; HARPUR, A.G.; KURBAN, R.R.; RALPH, S.J.; ZURCHER, G.; ZIEMIECKI, A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. **Mol Cell Biol**, v.11, n.4, p.2057–65, 1991.

WOLANSKYJ, A.P.; LASHO, T.L.; SCHWAGER, S.M.; MCCLURE, R.F.; WADLEIGH, M.; LEE, S.J.; GILLILAND, D.G.; TEFFERI, A. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and longterm prognostic relevance. **Br J Haematol**, v.131, n.2, p.208–13, 2005.

XIA, C.; XU, Z.; YUAN, X.; UEMATSU, K.; YOU, L.; LI, K.; LI, L.; MCCORMICK, F.; JABLONS, D.M. Induction of Apoptosis in Mesothelioma Cells by Antisurvivin Oligonucleotides. **Mol Cancer Ther**, v.1, n.9, p.687-94, 2002.

XING, S.; WANTING, T.H.; ZHAO, W.; MA, J.; WANG, S.; XU, X.; LI, Q.; FU, X.; XU, M.; ZHAO, Z.J. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. **Blood**, v.111, n.10, p.5109–17, 2008.

YAMAMOTO, H.; NGAN, C.Y.; MONDEN, M. Cancer cells survive with surviving. **Cancer Sci**, v.99, n.9, p.1709-14, 2008.

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

YEH, T.C.; DONDI, E.; UZE, G.; PELLEGRINI, S. A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, n.16, p.8991–6, 2000.

YEH, T.C.; PELLEGRINI, S. The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. **Cell Mol Life Sci**, v.55, n.12, p.1523-34, 1999.

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

ZALESKAS, V.M.; KRAUSE, D.S.; LAZARIDES, K.; PATEL, N.; HU, Y.; LI, S.; VAN ETTEN, R.A. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. **PLOS ONE**, v.1, n.1, p.e18, 2006.

ZHAO, R.; XING, S.; LI, Z.; FU, X.; LI, Q.; KRANTZ, S.B.; ZHAO, Z.J. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. **J Biol Chem**, v.280, n.24, p.22788–92, 2005.

ZHOU, J.; BI, C.; JANAKAKUMARA, J.V.; LIU, S.; CHNG, W.; TAY, K.; POON, L.; XIE, Z.; PALANIYANDI, S.; YU, H.; GLASER, K.B.; ALBERT, D.H.; DAVIDSEN, S.K.; CHEN, C. Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. **Blood**, v.113, n.17, p.4052-4062, 2009.

ZHOU, Y.J.; CHEN, M.; CUSACK, N.A.; KIMMEL, L.H.; MAGNUSON, K.S.; BOYD, J.G.; LIN, W.; ROBERTS, J.L.; LENGI, A.; BUCKLEY, R.H.; GEAHLEN, R.L.; CANDOTTI, F.; GADINA, M.; CHANGELIAN, P.S.; O'SHEA, J.J. Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. **Mol Cell**, v.8, n.5, p.959–69, 2001.

ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do Projeto de Pesquisa pelos Comitês de Ética de Pesquisa do HU-UFSC e do CEPON.

Anexo 2: *Termos de Consentimento Livre e Esclarecido*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Pesquisa da mutação no gene JAK2)
(Para a família de pacientes menores de 18 anos)

Título da pesquisa: Associação da Presença da Mutação JAK2V617F e da Expressão da Proteína Antiapoptótica Survivina na Evolução das Neoplasias Mieloproliferativas, BCR/ABL negativas.

O(a) Senhor(a), em nome do seu(informar o grau de parentesco e nome do paciente) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como as informações do seu (informar o grau de parentesco e nome do paciente) serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com um médico, para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

QUAL OBJETIVO DESTA PESQUISA E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo será realizado no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Michelle Maccarini Barcelos, sob a orientação da professora Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva.

O objetivo principal desta pesquisa é aprimorar o diagnóstico de Neoplasias Mieloproliferativas.

É OBRIGATÓRIO PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se seu (informar o grau de parentesco do paciente) irá ou não participar. Mesmo que o(a) senhor(a) não queira participar do estudo, o senhor(a) não terá nenhuma desvantagem. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre

e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para retirar seu.....(informar o grau de parentesco do paciente) do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência.

O QUE ACONTECERÁ SE EU ASSINAR ESSE TERMO?

A pesquisa será feita a partir de uma amostra de sangue do seu (informar o grau de parentesco do paciente), enviada até nós após a solicitação do médico(a) hematologista. Sendo assim, não haverá nenhum contato pessoal (do tipo avaliação física ou entrevistas efetuadas pela pesquisadora), pois será feita apenas a análise da sua amostra sanguínea do seu (informar o grau de parentesco do paciente) afim de investigação diagnóstica. Após esta etapa da pesquisa, também será realizada uma análise no prontuário médico do seu (informar o grau de parentesco do paciente), lembrando que serão utilizadas apenas informações clínicas relacionadas , os dados pessoais do paciente não serão utilizados na pesquisa e serão mantidos em sigilo.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Seu(informar o grau de parentesco do paciente) não irá sentir nenhum constrangimento pois não haverá avaliação física ou entrevista, apenas análise da amostra de sangue e prontuário médico. O único desconforto será a coleta da amostra, porém este procedimento é extremamente comum e necessário para o acompanhamento e tratamento de patologias. Durante a coleta de sangue seu(informar o grau de parentesco do paciente) pode sentir uma dor leve e passageira e ocasionalmente ocorrer o aparecimento de hematoma (mancha roxa) no local.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS DADOS PESSOAIS SERÃO UTILIZADOS?

Informo que os dados do seu (informar o grau de parentesco do paciente) serão mantidos sob sigilo absoluto e privado, de posse somente pelo pesquisador e orientador desta pesquisa. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que o(a) senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração. É importante ressaltar que o seu..... (informar o grau de parentesco do paciente) não será chamado à instituição especialmente para assuntos referentes à pesquisa em questão.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Espera-se, com esta pesquisa, reduzir os problemas envolvidos no diagnóstico diferencial das neoplasias mieloproliferativas com o desenvolvimento de um exame laboratorial específico para esta doença. Pode ser que o seu(informar o grau de parentesco do paciente) não tenha nenhum benefício com o estudo. Entretanto, as informações que obtivermos poderão nos ajudar a diagnosticar outras pessoas vítimas da mesma doença.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: 3721-8146

Pesquisadora: Michelle Maccarini Barcelos Fone: 3331-1451

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do CEPON: 3331-1502

Eu, (nome do familiar responsável em letras de forma).....

.....recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre a participação do meu (informar o grau de parentesco do paciente) nesta pesquisa. Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura da pessoa que aplicou este termo

Nome da pessoa que aplicou este termo

Assinatura do paciente

Nome do paciente

Assinatura da testemunha imparcial

Nome da testemunha imparcial

Data/...../.....

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Pesquisa da mutação no gene JAK2)

Título da pesquisa: Associação da Presença da Mutação JAK2V617F e da Expressão da Proteína Antiapoptótica Survivina na Evolução das Neoplasias Mieloproliferativas, BCR/ABL negativas.

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com o seu médico, para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

QUAL OBJETIVO DESTA ESTUDO E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo será realizado no Laboratório de Pesquisas Oncológicas Experimental e Hemopatias, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Michelle Maccarini Barcelos, sob a orientação da professora Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva.

O objetivo principal desta pesquisa é aprimorar o diagnóstico de Neoplasias Mieloproliferativas.

EU TENHO QUE PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) senhor(a) não queira participar do estudo, o senhor(a) não terá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao tratamento médico e aos cuidados que o(a) senhor(a) tenha direito de receber. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

A pesquisa será feita a partir da solicitação de seu médico hematologista, utilizando uma amostra sua de sangue periférico. Sendo assim, não haverá nenhum contato pessoal (do tipo avaliação física ou entrevistas efetuadas pela pesquisadora), pois será feita apenas a análise da sua amostra sanguínea afim de investigação diagnóstica. Após esta etapa da pesquisa, também será realizada uma análise do seu prontuário médico, lembrando que serão utilizadas apenas informações clínicas relacionadas à doença e os seus dados pessoais não serão utilizados na pesquisa, sendo mantidos em sigilo.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Você não irá sentir nenhum constrangimento pois não haverá avaliação física ou entrevista, apenas análise da sua amostra de sangue e prontuário médico. O único desconforto será a coleta da amostra, porém este procedimento é extremamente comum e necessário para o acompanhamento e tratamento de patologias. Durante a coleta de sangue você poderá sentir uma dor leve e passageira e ocasionalmente ocorrer o aparecimento de hematoma (mancha roxa) no local.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS DADOS PESSOAIS DO SENHOR(A) SERÃO UTILIZADOS?

Informo que seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto e privado, de posse somente pelo pesquisador e orientador desta pesquisa. Também não serão tiradas fotos, nem realizadas filmagens. E a divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que o(a) senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração. É importante ressaltar que o(a) senhor(a) não será chamado à instituição especialmente para assuntos referentes à pesquisa em questão.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Espera-se, com esta pesquisa, reduzir os problemas envolvidos no diagnóstico diferencial das neoplasias mieloproliferativas com o desenvolvimento de um exame laboratorial específico para esta doença. Pode ser que o(a) senhor(a) não tenha nenhum benefício com o estudo. Entretanto, as informações que obtivermos poderão nos ajudar a diagnosticar outras pessoas vítimas da mesma doença.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: 3721-8146

Pesquisadora: Michelle Maccarini Barcelos Fone: 3331-1451 ou 99631383

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do CEPON: 3331-1502

Eu, (nome do paciente ou responsável legal em letras de forma).....
.....recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa.

Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura da pessoa que aplicou este termo

Nome da pessoa que aplicou este termo

Assinatura do paciente

Nome do paciente

Assinatura da testemunha imparcial

Nome da testemunha imparcial

Data/...../.....

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Pesquisa da proteína survivina)
(Para a família de pacientes menores de 18 anos)

Título da pesquisa: Associação da Presença da Mutação JAK2V617F e da Expressão da Proteína Antiapoptótica Survivina na Evolução das Neoplasias Mieloproliferativas, BCR/ABL negativas.

O(a) Senhor(a), em nome do seu(informar o grau de parentesco e nome do paciente) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como as informações do seu (informar o grau de parentesco e nome do paciente) serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com um médico, para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

QUAL OBJETIVO DESTES ESTUDO E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo está sendo realizado no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Oncológicas – CEPON e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Michelle Maccarini Barcelos, sob a orientação da professora Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva.

O objetivo principal desta pesquisa é aprimorar o acompanhamento de pacientes com diagnóstico de Neoplasias Mieloproliferativas.

É OBRIGATÓRIO PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se seu (informar o grau de parentesco do paciente) irá ou não participar. Mesmo que o(a) senhor(a) não queira participar do estudo, o senhor(a) não terá nenhuma desvantagem. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre

e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para retirar seu.....
(informar o grau de parentesco do paciente) do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência.

O QUE ACONTECERÁ SE EU ASSINAR ESSE TERMO?

Será realizada uma avaliação do material de biópsia de medula óssea do seu (informar o grau de parentesco do paciente), que encontra-se no arquivo do laboratório de anatomia patológica. Sendo assim, não haverá nenhum contato pessoal (do tipo avaliação física ou entrevistas), pois será utilizado a biópsia emblocada em parafina para investigar se a presença de uma determinada proteína pode interferir na evolução e/ou tratamento da doença do seu (informar o grau de parentesco do paciente). É importante ressaltar que após a análise do material, o mesmo voltará para os arquivos do laboratório de patologia. Após esta etapa da pesquisa, também será realizada uma análise no prontuário médico do seu (informar o grau de parentesco do paciente), lembrando que serão utilizadas apenas informações clínicas relacionadas à doença, os dados pessoais do paciente não serão utilizados na pesquisa e serão mantidos em sigilo.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

O seu(informar o grau de parentesco do paciente) não irá sentir nenhum constrangimento pois não haverá avaliação física ou entrevista, apenas análise do material emblocado em parafina que consta no arquivo do Laboratório de Patologia/CEPON e análise do prontuário médico.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS DADOS PESSOAIS SERÃO UTILIZADOS?

Informo que os dados do seu(informar o grau de parentesco do paciente) serão mantidos sob sigilo absoluto e privado,

de posse somente pelo pesquisador e orientador desta pesquisa. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que o(a) senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração. É importante ressaltar que o seu..... (informar o grau de parentesco do paciente) não será chamado à instituição especialmente para assuntos referentes à pesquisa em questão.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Espera-se reduzir os problemas envolvidos no tratamento de neoplasias mieloproliferativas crônicas, BCR/ABL negativas. Pode ser que o(a) senhor(a) não tenha nenhum benefício com o estudo. Entretanto, as informações que obtivermos poderão nos ajudar a diagnosticar outras pessoas vítimas de doenças oncohematológicas.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: 37218146

Pesquisadora: Michelle Maccarini Barcelos Fone: 99631383 ou 33311451

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do CEPON: 3331-1502

Eu, (nome do familiar responsável em letras de forma).....

.....recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre a participação do meu (informar o grau de parentesco do paciente) nesta pesquisa.

Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura da pessoa que aplicou este termo

Nome da pessoa que aplicou este termo

Assinatura do paciente

Nome do paciente

Assinatura da testemunha imparcial

Nome da testemunha imparcial

Data/...../.....

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Pesquisa da proteína survivina)**

Título da pesquisa: Associação da Presença da Mutação JAK2V617F e da Expressão da Proteína Antiapoptótica Survivina na Evolução das Neoplasias Mieloproliferativas, BCR/ABL negativas.

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com o seu médico, para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

QUAL OBJETIVO DESTES ESTUDO E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo está sendo realizado no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Oncológicas – CEPON e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Michelle Maccarini Barcelos, sob a orientação da professora Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva.

O objetivo principal desta pesquisa é aprimorar o acompanhamento de pacientes com diagnóstico de Neoplasias Mieloproliferativas.

EU TENHO QUE PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) senhor(a) não queira participar do estudo, o senhor(a) não terá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao tratamento médico e aos cuidados que o(a) senhor(a) tenha direito de receber. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para

isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

Será realizada uma avaliação do seu material de biópsia de medula óssea que encontra-se no arquivo do laboratório de anatomia patológica. Sendo assim, não haverá nenhum contato pessoal (do tipo avaliação física ou entrevistas), pois será utilizado a biópsia emblocada em parafina para investigar se a presença de uma determinada proteína pode interferir na evolução e/ou tratamento da sua doença. É importante ressaltar que após a análise do material, o mesmo voltará para os arquivos do laboratório de patologia. Após esta etapa da pesquisa também será realizada uma análise do seu prontuário médico, lembrando que serão utilizadas apenas informações clínicas relacionadas à doença e os seus dados pessoais não serão utilizados na pesquisa, sendo mantidos em sigilo.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Você não irá sentir desconforto algum pois não haverá avaliação física, apenas avaliação do seu material de biópsia que encontra-se no arquivo do laboratório de patologia e análise do prontuário médico.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS DADOS PESSOAIS DO SENHOR(A) SERÃO UTILIZADOS?

Informo que seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto e privado, de posse somente pelo pesquisador e orientador desta pesquisa. Também não serão tiradas fotos, nem realizadas filmagens. E a divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que o(a) senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração. É importante ressaltar que o(a) senhor(a) não será chamado à instituição especialmente para assuntos referentes à pesquisa em questão.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Espera-se reduzir os problemas envolvidos no tratamento de neoplasias mieloproliferativas crônicas, BCR/ABL negativas. Pode ser que o(a) senhor(a) não tenha nenhum benefício com o estudo. Entretanto, as informações que obtivermos poderão nos ajudar a diagnosticar outras pessoas vítimas de doenças oncohematológicas.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: 37218146.

Pesquisadora: Michelle Maccarini Barcelos Fone: 99631383 ou 33311451.

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do CEPON: 3331-1502.

Eu, (nome do paciente ou responsável legal em letras de forma).....

.....recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa.

Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura da pessoa que aplicou este termo

Nome da pessoa que aplicou este termo

Assinatura do paciente

Nome do paciente

Assinatura da testemunha imparcial

Nome da testemunha imparcial

Data/...../.....

Anexo 3: Abordagem molecular no diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR/ABL negativas.

Artigo Publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

**Abordagem molecular no diagnóstico das neoplasias
mieloproliferativas crônicas BCR/ABL negativas**

Molecular approach on diagnosis of BCR/ABL negative chronic
myeloproliferative neoplasms

Michelle Maccarini Barcelos¹, Maria Cláudia Santos-Silva^{2*}

¹ Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); ² Professora Ph.D. do
Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa
Catarina (UFSC)

Título resumido: Diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas
crônicas

* Correspondência:

Santos-Silva MC, Departamento de Análises Clínicas, Centro de
Ciências da Saúde Universidade Federal de Santa Catarina

Hospital Universitário – HU/Universidade Federal de Santa Catarina –
UFSC

Campus Universitário – Trindade

88040-970 – Florianópolis – SC – Brasil

Tel.: +55 48 37218146

Fax: +55 48 37219542

E-mail: maclau@ccs.ufsc

Resumo

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPCs) são neoplasias originadas por uma proliferação clonal de um progenitor hematopoiético pluripotencial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são classificadas em: leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP), leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica (LEC), síndrome hipereosinofílica (SHE), doença do mastócito (DM) e neoplasias mieloproliferativas sem classificação (NMPSC). De acordo com a revisão dos critérios adotados para o diagnóstico das NMPCs realizado pela OMS 2008, a expressão da mutação JAK2V617F é considerada como critério de maior importância para o diagnóstico de PV, e na TE e MFP representa um marcador clonal. Existem, atualmente, duas hipóteses que explicam o papel da mutação JAK2V617F nas NMPCs. De acordo com essas hipóteses, a mutação assume um papel primário ou secundário no desenvolvimento da doença. A descoberta da mutação JAK2V617F foi fundamental para o entendimento da base genética das NMPCs, fornecendo algumas ideias de como uma única mutação pode resultar em três fenótipos diferentes nas NMPCs, porém existem ainda algumas questões a serem elucidadas. Assim, estudos são necessários para determinar marcadores moleculares específicos para cada subtipo de NMPC.

Palavras-chave: Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas; JAK2; JAK2V617F.

Abstract

The chronic myeloproliferative neoplasms (CMPNs) arise from clonal proliferation of hematopoietic stem cells. According to the World Health Organization (WHO), myeloproliferative neoplasms (MPNs) are classified as: Chronic Myelogenous Leukemia (CML), Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET), Primary Myelofibrosis (PMF), Chronic Neutrophilic Leukemia (CNL), Chronic Eosinophilic Leukemia (CEL), Hypereosinophilic Syndrome (HES), Mast cell Disease (MD), and unclassifiable Myeloproliferative Neoplasms (unclassifiable MPNs). In the revised 2008 WHO diagnostic criteria for MPN, mutation screening for JAK2V617F is considered a major criterion for PV diagnosis, and in the case of ET and MFP, the presence of the mutation represents a clonal marker. There are currently two hypotheses explaining the role of JAK2V617F mutation in CMPNs. According to them, the mutation plays either a primary or secondary role in disease development. The discovery of the JAK2V617F mutation has been essential in understanding the genetic basis of CMPNs, providing some idea regarding how a single mutation can result in three different CMPN phenotypes, but there are still some issues to be clarified. Thus, studies are still needed to determine specific molecular markers for each subtype of CMPN.

Key words: *Chronic myeloproliferative neoplasms, JAK2, JAK2V617F.*

Introdução

As desordens hematológicas malignas são amplamente classificadas em mieloides e linfoides, de acordo com as características morfológicas e imunofenotípicas da população celular clonal afetada.¹ Entre as desordens mieloides estão as neoplasias mieloproliferativas (NMPs), as quais são originadas por uma proliferação clonal de um progenitor hematopoiético pluripotencial. Essas neoplasias são caracterizadas pela produção excessiva de células sanguíneas maduras da linhagem mielóide, as quais são independentes e/ou hipersensíveis às citocinas para sobrevivência, proliferação e diferenciação celular.²⁻⁵

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu novos critérios para o diagnóstico e classificação das neoplasias mieloides.⁶ De acordo com esses critérios, as neoplasias mieloides foram classificadas em: leucemia mielóide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP), leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica (LEC), síndrome hipereosinofílica (SHE), doença do mastócito (DM) e neoplasias mieloproliferativas sem classificação (NMPSC).⁷

Em 1951, William Dameshek descreveu a relação existente entre a PV, a TE e a MFP, propondo que essas doenças, juntamente com a LMC e a eritroleucemia, fossem agrupadas em uma categoria geral de síndromes mieloproliferativas.^{8,9} No entanto, ao longo dos anos, essa classificação foi reavaliada e, atualmente, a PV, a TE e a MFP são denominadas de neoplasias mieloproliferativas crônicas clássicas (NMPCs) BCR/ABL negativas.⁷ Essas três neoplasias compartilham algumas características clínicas, como a presença de células-tronco

hematopoiéticas independentes de fatores de crescimento para proliferação, hiperplasticidade da medula óssea, risco aumentado de eventos trombóticos e hemorragia, conversão espontânea à leucemia aguda e fibrose da medula óssea.¹⁰

Na literatura, algumas evidências sugerem que características moleculares observadas nas NMPCs são ocasionadas devido a desordens no processo de sinalização celular hematopoiético. Por exemplo, Gitler e colaboradores¹¹ mostraram que a superexpressão de fatores de crescimento, que atuam como mediadores de sinalização celular, é capaz de induzir NMP em ratos. Já Roder e colaboradores¹² demonstraram que células hematopoiéticas de pacientes com NMPCs expressam moléculas de sinalização constitutivamente ativadas. Por último, Axelrad e colaboradores¹³ observaram que progenitores hematopoiéticos são hipersensíveis a vários fatores de crescimento na PV, na MFP e na TE. Com base nessas e em outras evidências, alguns grupos de pesquisadores hipotetizaram que anormalidades na proteína *Janus kinase 2* (JAK2) poderiam estar relacionadas às NMPCs, uma vez que essa proteína é a responsável pela ativação de várias moléculas envolvidas nos processos de sinalização celular.¹⁴ Essa hipótese foi confirmada em 2005, quando quatro grupos diferentes de pesquisa identificaram uma mutação pontual no éxon 14 do gene JAK2, que acarreta a substituição de uma valina por uma fenilalanina no códon 617 da proteína (JAK2V617F). Essa mutação foi descrita em mais de 95% dos casos de PV e em aproximadamente 50% dos casos de TE e de MFP.^{3,15,16} A incidência da JAK2V617F em PV, TE e MFP foi confirmada por vários estudos subsequentes, os quais também

verificaram a ausência dela em células normais e raros aparecimentos em outras desordens hematológicas.¹⁷

Estrutura e Mecanismos Regulatórios do gene JAK2

O gene JAK2 é membro da família *Janus kinases* (JAKs) juntamente com mais três genes: JAK1, JAK3 e Tyk2.^{1,18} Essa família possui sete domínios homólogos (JH), denominados de 1 a 7, além de uma porção carboxila inicial e de uma amino terminal. Partindo do domínio carboxila em direção ao amino terminal, o domínio JH1 representa o domínio quinase, e o JH2, o domínio pseudoquinase; o JH3 e o JH4 são domínios homólogos do tipo Src 2 (SH2), enquanto os domínios JH5 a JH7 contêm domínios homólogos 4,1, ezrina, radixina, moesina (FERM).¹⁶ Estruturalmente, as JAKs podem ser divididas em duas partes. A parte amino terminal é importante para a ligação aos receptores e possui funções estabilizadoras de superfície; já os domínios quinases (parte carboxila terminal) são cruciais para a regulação do processo de sinalização celular.¹⁶ Estudos realizados revelam importante ação do domínio FERM nas interações das JAKs com receptores de citocina transmembrana e na regulação da atividade quinase.¹⁹ Já o papel do domínio SH2 nas JAKs não está muito claro, embora em outras proteínas quinases ele exerça um papel fundamental para a afinidade da molécula com resíduos de fosfotirosina.¹⁹ O domínio pseudoquinase precede o quinase e, devido à diferença de resíduos necessários para a atividade catalítica, ele não pode transferir fosfato e por isso é chamado de cataliticamente inativo.^{16,20} No entanto, o domínio pseudoquinase é estruturalmente necessário para a resposta das JAKs à ativação dos

receptores de citocina e para a inibição basal da atividade do domínio quinase.^{1,16} A mutação JAK2V617F ocorre no domínio pseudoquinase, o que resulta em uma ativação constitutiva do domínio quinase (Figura 1).¹⁶ Devido a esse fato, foi possível concluir que o domínio pseudoquinase é responsável por manter o domínio quinase inativo no estado basal.²¹ Modelos moleculares do gene JAK2 sugerem que a mutação no domínio JH2 desestabiliza a conformação estrutural da proteína,¹⁷ o que impede o efeito inibitório desse domínio sobre o JH1, levando à atividade quinase constitutiva característica das NMPCs.²²

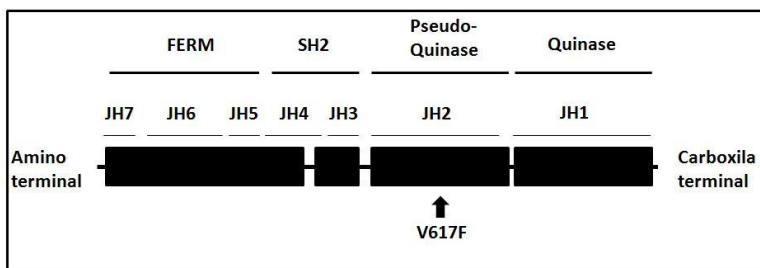


Figura 1. Representação esquemática do gene JAK2 mutado. Adaptado de RADTCKE et al., 2005.

Atividade quinase da proteína JAK2 e a mutação JAK2V617F

A proteína JAK2 é membro da família das tirosina quinases, que são enzimas capazes de catalisar a transferência de fosfato da molécula de ATP para resíduos de tirosina presentes em seu próprio domínio citoplasmático (autofosforilação) e resíduos de tirosina de outras proteínas intracelulares.^{9,23} Essas proteínas são componentes vitais para o mecanismo de sinalização relacionado a funções celulares essenciais, como a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência.²⁴

Em indivíduos sadios, a JAK2 funciona em associação com receptores que não possuem atividade quinase intrínseca. A ligação de citocina, hormônios e fatores de crescimento aos seus receptores específicos resulta em uma multimerização destes, cujos domínios citoplasmáticos estão associados com a JAK2.^{1,25} Essa mudança conformacional resulta numa autofosforilação e ativação da proteína JAK2, que, conseqüentemente, atua na fosforilação do receptor e no recrutamento e fosforilação de várias proteínas que atuam nas vias de sinalização celular. Portanto, a função da proteína JAK2 é agir como mediador entre o receptor de membrana e as moléculas de sinalização celular.²⁰ Inclusive, alguns trabalhos demonstram que a JAK2 é a única *Janus kinase* responsável pela sinalização dos receptores de eritropoetina (EPO), uma vez que a deleção desse gene ocasiona letalidade embrionária devido à falta de eritropoiese,²⁶ e progenitores hematopoiéticos deficientes de JAK2 não respondem a estímulos da EPO.²⁷

A mutação JAK2V617F confere uma atividade quinase constitutiva à proteína. Sendo assim, esta permanece constantemente fosforilada,²⁸ o que leva à proliferação descontrolada de células hematopoiéticas, independentemente de citocinas. Tal evento é observado em colônias hematopoiéticas de pacientes com PV.²⁹ Essa transformação mediada pela mutação JAK2V617F é mais eficiente em células hematopoiéticas que coexpressam o receptor de eritropoetina (EPOR), receptor de trombopoetina (MPL) ou receptor de fator estimulante de colônia de granulócitos (GCSFR). Diferentemente da maioria dos receptores de citocina, EPOR, MPL e GCSFR são

receptores homodiméricos do tipo I, os quais são expressos nas células de linhagem eritrocítica, megacariocítica e granulocítica respectivamente. Assim, a predileção da mutação JAK2V617F por neoplasias proliferativas envolvendo essas três linhagens pode ser explicada, em parte, pela expressão diferencial desse tipo de receptor de citocina durante a diferenciação hematopoiética.³⁰

Estudos *in vitro* demonstraram que a expressão da mutação JAK2V617F ativa múltiplas vias de sinalização, o que contribui para o processo de transformação neoplásica com o aumento da proliferação e inibição da apoptose. Entre as proteínas envolvidas nas vias de sinalização estão as proteínas ativadoras de transcrição e transdutoras de sinal (STATs), principalmente a STAT5, que, entre outras funções, regula positivamente a produção da proteína antiapoptótica Bcl-xL.³¹ Após a ativação das STATs, ocorre a dimerização dessa proteína e a translocação para o núcleo celular, onde ela interage com domínios específicos do DNA, induzindo a transcrição do gene-alvo.²⁵ Muitas evidências sugerem que a ativação constitutiva da STAT5 representa o principal motivo para o processo de transformação maligna que leva ao desenvolvimento de NMPCs.³² No entanto, a função-chave das STATs nesse processo de transformação ainda não está completamente elucidada.⁹ Outras vias podem estar envolvidas, como, por exemplo, a PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), a mTOR (*mammalian target of rapamycin*), a MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e a AKT (*protein kinase B*), as quais já foram bem caracterizadas em modelos de leucemia.³³

A ativação exacerbada das vias de sinalização provocada pela JAK2V617F pode, em parte, ser explicada pelo fato de que as células com essa mutação conseguem escapar de um mecanismo de *feedback* negativo importante, que atenua a sinalização ocasionada pela proteína JAK2.³⁴ O principal mecanismo de regulação das *Janus kinases* é mediado por famílias de proteínas intracelulares, cuja principal função, justamente, é regular negativamente a transdução de sinal realizada por citocinas. Entre essas proteínas estão as supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) e as indutoras de citocinas contendo domínio SH2 (CIS).³⁵ As SOCS normalmente ligam-se às *JAKs kinases*, o que resulta na degradação destas. Em particular, as proteínas SOCS1 e SOCS3 são as responsáveis pela ligação à JAK2 e pela inibição de sua atividade catalítica. Embora a expressão da SOCS1 resulte em degradação da JAK2 e da JAK2V617F, o que leva à inibição da atividade quinase, a expressão da SOCS3, paradoxalmente, resulta em um aumento da estabilidade e atividade da proteína JAK2V617F, ou seja, a proteína JAK2 constitutivamente ativada pode dar origem à hiperfosforilação da proteína SOCS3, o que resulta no aumento da proliferação celular. Nesse caso, a SOCS3 age como um potencializador da sinalização mediada pela JAK2.³⁶

Após a descoberta da mutação, tornou-se claro que essa anormalidade molecular poderia ser usada como marcador clonal para diagnóstico de NMPCs. Inicialmente, os resultados indicaram que a mutação JAK2V617F provavelmente seria específica de precursores da linhagem mieloide, uma vez que não era encontrada em linfócitos. Entretanto, com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis,

observou-se em alguns pacientes uma pequena fração de linfócitos e células *natural killer* com a mutação JAK2V617F.^{15,37} Esses dados sugerem que as células adquirem a mutação em estágios iniciais da diferenciação, o que corrobora a hipótese de que as NMPCs são desordens originadas em células-tronco hematopoiéticas.³⁷

Complexidade genética das NMP

Existem ainda algumas questões a serem elucidadas sobre as NMPCs. A principal delas, do ponto de vista patogenético, é esclarecer como uma única mutação pontual pode estar associada à patogênese de três doenças distintas: PV, TE e MFP. Algumas hipóteses são propostas para explicar as diferenças fenotípicas existentes entre elas.³⁸

Existem, atualmente, duas hipóteses que explicam o papel da mutação JAK2V617F nas NMPCs.^{2,3,27,39-41} De acordo com essas hipóteses, a mutação assume um papel primário ou secundário no desenvolvimento da doença. Na primeira hipótese, a JAK2V617F, simultaneamente, induz a hematopoiese clonal e inicia o fenótipo mieloproliferativo. O desenvolvimento de cada uma das NMPCs é influenciado por fatores genéticos constitutivos de cada paciente. Já a segunda hipótese defende que outras mutações adquiridas antes da JAK2V617F são as responsáveis pelo desenvolvimento do clone hematopoiético anormal. Essas mutações, denominadas “pré-JAK2”, além de propiciar a aquisição da mutação JAK2V617F, determinam qual a NMPC que o indivíduo desenvolverá.⁴² Portanto, de acordo com essa hipótese, o desenvolvimento da mutação é um evento que ocorre durante

a evolução clonal das NMPCs (Figura 2).⁴¹ Alguns trabalhos apresentam dados que corroboram o modelo que sugere a presença de mutações prévias à JAK2V617F.^{9,39} Sabe-se que algumas anormalidades citogenéticas, como a deleção do cromossomo 20q, são frequentemente observadas em pacientes com NMPC.³⁹ Com base nesse fato, estudos avaliaram a presença de anormalidades citogenéticas em células de pacientes com NMPC e constataram que todas as células hematopoiéticas desses pacientes apresentavam a deleção do cromossomo 20q, enquanto apenas uma porção dessas células era positiva para a mutação JAK2V617F, comprovando o modelo de que a existência de uma mutação primária estabelece um perfil clonal que propicia a ocorrência da mutação no gene JAK2.³⁸ No entanto, existem dois principais argumentos contra a hipótese de que a mutação é um evento secundário nas NMPCs. Primeiro, não existem relatos de pacientes identificados como sendo negativos para JAK2V617 no momento do diagnóstico e que tenham adquirido a mutação posteriormente, durante o curso da doença.⁴³ Segundo, em pesquisas com animais, a mutação JAK2V617F, por si só, é capaz de rapidamente desenvolver uma patologia semelhante à PV de humanos.³²

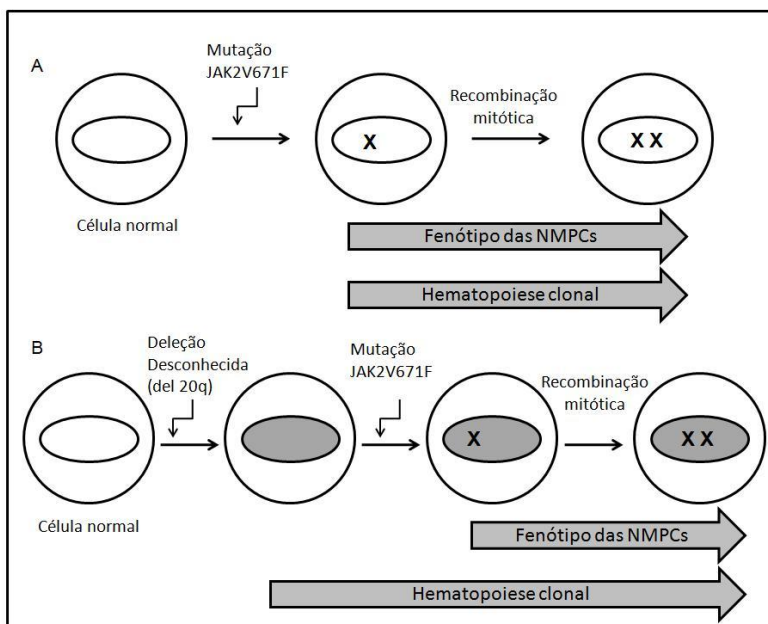


Figura 2. Representação das duas hipóteses sobre a patogênese das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR/ABL negativas. No modelo A, a mutação JAK2V617F (X) ocasiona a hematopoiese clonal e o fenótipo das NMPCs BCR/ABL negativas ao mesmo tempo. No modelo B, a aquisição de uma mutação somática desconhecida ocasiona a hematopoiese clonal (exemplificada pela deleção do cromossomo 20q; del 20q, círculo cinza). A mutação JAK2V617F é adquirida posteriormente ao evento que causa a hematopoiese clonal, e neste momento ocorre o fenótipo das NMPCs BCR/ABL negativas. Em alguns pacientes, a recombinação mitótica resulta na transição de células JAK2V617F heterozigóticas para células homozigóticas para a mutação (XX). Adaptado de KOTA et al., 2008.

Outro fato importante para o entendimento da patogênese das NMPCs foi relatado por Kralovics e colaboradores.⁴⁴ Esses pesquisadores verificaram que a perda da heterozigozidade (PH) do

cromossomo 9p é um evento relativamente comum na PV. Nesse importante estudo, demonstrou-se que, diferentemente do que ocorre na maioria dos tumores em que a PH é comumente resultado de uma deleção da cópia não mutada do gene, na PV tal evento é resultado de uma dissomia uniparental adquirida (DUA),^{3,27,44} na qual ocorre uma recombinação mitótica entre regiões homólogas dos cromossomos 9 heretozigóticos. Sabe-se que essa recombinação mitótica resulta na formação de cromossomos homozigóticos para a mutação, os quais possuem uma vantagem proliferativa adicional quando comparados aos heretozigóticos (Figura 3).³

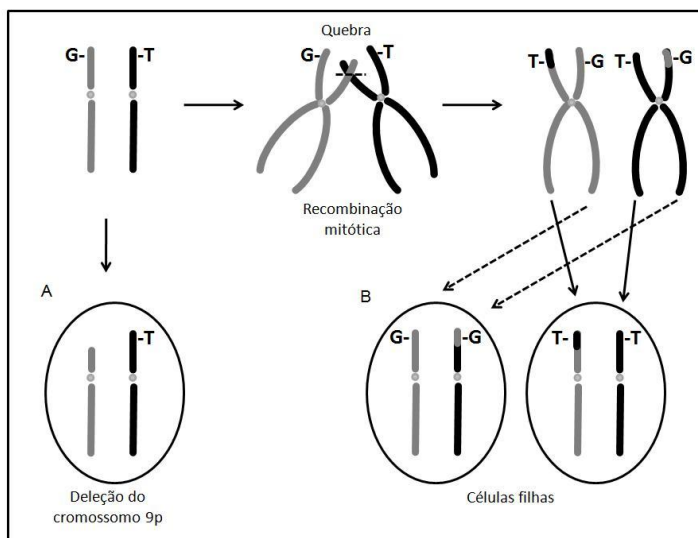


Figura 3. Representação dos mecanismos envolvidos na perda da heteroziguidade do cromossomo 9p. Nesta figura são apresentados dois modelos alternativos, A e B. O cromossomo 9 com a sequência selvagem do gene JAK2 (G) é representado pela cor cinza, e o cromossomo 9 com a mutação é representado pela cor preta (T). Os círculos simbolizam o núcleo celular. Em A, é demonstrado a deleção da parte telomérica do cromossomo 9p selvagem como um mecanismo provável para a perda da heteroziguidade do cromossomo 9p. Em B, é demonstrado que a recombinação mitótica também pode resultar na perda da heteroziguidade do cromossomo 9p. Os eventos que ocorrem durante a mitose e as células progenitoras resultantes da recombinação mitótica do cromossomo 9p também são mostrados na figura. Adaptado de KRALOVICS et al., 2005.

Como visto anteriormente, alguns estudos sobre a mutação JAK2V617F em linhagens celulares e em modelos animais comprovam seu perfil oncogênico, assim como o potencial de ocasionar NMPCs.^{4,32,45} Esses trabalhos mostram que em modelos de transplante de medula óssea e em ratos transgênicos a mutação JAK2V617F é capaz

de induzir fenótipo mieloproliferativo, de maneira semelhante ao que acontece nas NMPCs humanas. No entanto, observou-se uma diferença na intensidade da indução de eritrocitose, leucocitose e fibrose medular em linhagens de ratos com e sem outras alterações genéticas presentes.^{32,46} Essa observação revela que diferentes tipos de alterações genéticas podem modificar o fenótipo induzido pela JAK2V617F.^{2,32,41,42,46} Kralovics e colaboradores⁴¹ mostraram em experimentos com animais transgênicos que o nível de expressão da mutação JAK2V617F também interfere no fenótipo apresentado. Por exemplo, animais com baixa expressão da mutação desenvolveram trombocitemia, e os que apresentavam alta expressão desenvolveram policitemia. Como já mencionado, a homoziguidade para mutação JAK2V617F é o resultado de DUA no cromossomo 9p24. Alguns estudos demonstraram que essa homoziguidade é mais comum em PV do que em TE.^{3,7,15,38,47,48} Com isso, pode-se supor que DUA no cromossomo 9p24 e a homoziguidade para a mutação JAK2V617F são comuns no desenvolvimento da PV, mas não na TE.^{3,4,15,46,47} Estudos *in vivo* são consistentes com a hipótese de que a superexpressão da JAK2V617F nos compartimentos hematopoiéticos causa policitemia e leucocitose sem trombocitose associada^{32,38,49} e que a baixa expressão dessa mutação está relacionada com a trombocitose.^{42,45} Alguns trabalhos revelam a existência de uma predisposição familiar para o desenvolvimento das NMPCs, o que reforça a hipótese da presença de alelos que fornecem uma vantagem seletiva específica para o desenvolvimento da mutação.^{50,51} A NMP familiar é caracterizada por uma herança autossômica dominante, com penetração incompleta e presença variável das três NMPCs com características clínicas e

moleculares indistinguíveis das NMPCs esporádicas.^{50,52} Em todos os casos examinados, a mutação JAK2V617F é adquirida; nunca herdada através da linhagem germinal.⁵¹ A penetrância do fenótipo é dita incompleta, pois as mutações presentes na linhagem germinativa herdada não causam por si só NMPCs, que dependem da ocorrência da mutação somática do gene JAK2.⁴¹

Pardani e colaboradores⁵³ realizaram pesquisa sobre a influência fenotípica de polimorfismos de base única (SNPs) no gene JAK2. Nesse trabalho, foram analisados 32 SNPs em 179 pacientes com diferentes NMPCs. Verificou-se que polimorfismos de base única estavam associados com PV ou TE. Apesar de tratar-se de um único estudo, ele fornece evidências de que variações genéticas de cada indivíduo são relevantes para o fenótipo das NMPCs.⁴²

Diagnóstico laboratorial

Até recentemente, não havia nenhum exame laboratorial específico para a realização do diagnóstico de NMPC BCR/ABL negativa.¹⁰ Os critérios para o diagnóstico de PV foram amplamente modificados desde a padronização realizada pelo Grupo de Estudos em Policitemia Vera (PVSG), há mais de vinte anos.^{2,54} Os testes realizados eram caros e não estavam disponíveis universalmente. Além disso, os exames apresentavam baixa sensibilidade e especificidade. Entre essas análises estava a determinação da massa eritrocitária para distinguir eritrocitose verdadeira de policitemia relativa, identificação de crescimento de colônias eritroides independentes de eritropoetina *in vitro*, análise citogenética de células da medula óssea, verificação dos

níveis de EPO, ultrassonografia do baço e teste da superexpressão de policitemia rubra vera 1 (PRV1).⁵⁵

Atualmente, de acordo com a revisão dos critérios adotados para o diagnóstico das NMPCs, realizado pela OMS em 2008, a presença de mutação no gene JAK2 é considerada critério de maior importância para o diagnóstico de PV,^{4,27} e na TE e na MFP representa um marcador clonal.^{6,18} Além disso, a presença dessa mutação distingue a mieloproliferação clonal das NMPCs daquelas observadas na policitemia secundária, fibrose ou trombocitose reativas. A investigação da mutação JAK2V617F pode ser realizada por algumas metodologias, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) alelo específico,^{15,56,57} PCR em tempo real,⁵⁸ pirosequenciamento⁴⁷ e PCR com digestão enzimática.^{15,57}

Na prática clínica, a pesquisa da mutação JAK2V617F é realizada como triagem em pacientes com nível de hemoglobina aumentado, trombocitose, neutrofilia, esplenomegalia de origem desconhecida e trombose de veia abdominal. Nesses casos, a detecção da mutação confirma a presença de NMPC, enquanto a ausência possui valor limitado para a realização do diagnóstico.^{56,59}

Apesar de as metodologias disponíveis para detecção da mutação no gene JAK2 não estarem bem padronizadas, elas são amplamente disponíveis e sensíveis o suficiente para detectar a presença de mutação heterozigótica em 5% a 10% das células. Além disso, possuem baixos índices de resultados falso-positivos, o que faz desses ensaios ótimas ferramentas para uso diagnóstico.² No entanto, a possibilidade de resultados falso-positivos e falso-negativos não pode ser ignorada, principalmente levando em consideração a realização de

testes alelo específicos altamente sensíveis e presença de pacientes com índices muito baixos de alelos mutados (menores que 5%) respectivamente.^{6,60} Esses aspectos foram levados em consideração pela OMS na reformulação dos parâmetros adotados para o diagnóstico, no qual a análise histológica da medula óssea é considerada como critério necessário para o diagnóstico de TE, MFP e PV na ausência da mutação no gene JAK2. Além desse, outros parâmetros foram considerados como critérios de maior ou menor importância para o diagnóstico diferencial das NMPCs, como pode ser observado nos Quadros 1, 2 e 3.⁵⁶

Quadro 1. Critérios diagnósticos para PV de acordo com a OMS (2008)

| POLICITEMIA VERA (PV)* | |
|-------------------------------|---|
| Maior importância | 3- Hgb > 18,5 g/dl (homens), Hgb > 16,5 g/dl (mulheres) Ou Hgb > 17 g/dl (homens), Hgb > 15 g/dl (mulheres) se associado com aumento \geq 2 g/dl do valor basal sem que esteja atribuído a correção por deficiência por ferro Ou Aumento da massa eritrocitária > 25% acima do valor normal 4- Presença de mutação JAK2V617F |
| Menor importância | 4- Mieloproliferação das três linhagens na MO 5- Nível de Epo sérica abaixo do normal 6- Crescimento de CEE |

Adaptado de TEFFERI e VARDIMAN, 2008.

Abreviações: CEE, colônia eritroide endógena; Epo, eritropoetina; Hgb, hemoglobina; OMS, Organização Mundial de Saúde.

*Para o diagnóstico de Policitemia Vera (PV), deve-se ter todos os critérios de maior importância e um de menor importância ou o primeiro critério de maior importância juntamente com dois de menor importância.

Quadro 2. Critérios diagnósticos para TE de acordo com a OMS (2008)

| TROMBOCITEMIA ESSENCIAL (TE)* | |
|--------------------------------------|---|
| Maior importância | <ol style="list-style-type: none"> 1- Contagem de plaquetas $\geq 450.000/\text{mm}^3$ 2- Proliferação de megacariócitos maduros e de tamanho aumentado 3- Nenhum critério diagnóstico da OMS para LMC, PV, MFP, SMD ou outra neoplasia mieloide 4- Detecção da mutação JAK2V617F ou de outro marcador clonal Ou Nenhuma evidência de trombocitose reativa |

Adaptado de TEFFERI e VARDIMAN, 2008.

Abreviações: LMC, leucemia mieloide crônica; MFP, mielofibrose primária; SMD, síndrome mielodisplásica; OMS, Organização Mundial de Saúde.

*Para o diagnóstico de Trombocitemia Essencial (TE), deve-se ter todos os critérios de maior importância.

Quadro 3. Critérios diagnósticos para MFP de acordo com a OMS (2008)

| MIELOFIBROSE PRIMÁRIA (MFP)* | |
|-------------------------------------|---|
| Maior importância | <p>4- Proliferação de megacariócitos e atipia acompanhada de fibrose reticulínica e colágena Ou Na ausência de fibrose reticulínica, as mudanças nos megacariócitos devem estar acompanhadas de aumento da celularidade medular, proliferação granulocítica e geralmente diminuição da eritropoiese.</p> |
| Menor importância | <p>5- Nenhum critério diagnóstico da OMS para LMC, PV, SMD ou outra neoplasia mieloide.</p> <p>6- Detecção da mutação JAK2V617F ou de outro marcador clonal Ou Nenhuma evidência de fibrose medular reativa</p> <p>5- Leucoeritroblastose</p> <p>6- Aumento dos níveis de LDH sérico</p> <p>7- Anemia</p> <p>8- Esplenomegalia palpável</p> |

Adaptado de TEFFERI e VARDIMAN, 2008.

Abreviações: LMC, leucemia mieloide crônica; SMD, síndrome mielodisplásica; OMS, Organização Mundial de Saúde.

Considerações finais

A descoberta da mutação JAK2V617F foi fundamental para estabelecer ideias cruciais ao entendimento da base genética das NMPCs, porém muitas questões ainda permanecem sem resposta.²⁷ Apesar de trabalhos na literatura fornecerem uma ideia de como uma única mutação pode resultar em três fenótipos diferentes, estudos ainda são necessários para determinar marcadores moleculares específicos para cada subtipo de NMPC.⁵³

Referências

1. Tefferi A, Gilliland DG. Jak2 in myeloproliferative disorders is not just another kinase. *Cell Cycle*. 2005;4(8):1053-56.
2. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2452-66.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of jak2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-90.
4. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-68.
5. Kota J, Caceres N, Constantinescu SN. Aberrant signal transduction pathway in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2008;22(10):1828-40.
6. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 world health organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14-22.
7. Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases

(CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics and molecular markers. *Ann Hematol.* 2008;87(1):1-10.

8. Goldman JM. A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1744-6.
9. Walz C, Cross NC, Van Etten RA, Reiter A. Comparison of mutated ABL1 and JAK2 as oncogenes and drug targets in myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 2008;22(7):1320-34.
10. Schafer A. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood.* 2006;107(11):4214-22.
11. Gitler AD, Kong Y, Choi JK, Zhu Y, Pear WS, Epstein JA. Tie2-Cre-induced inactivation of a conditional mutant Nfl allele in mouse results in a myeloproliferative disorder that models juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Res.* 2004;55(4):581-4.
12. Roder S, Steimle C, Meinhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol.* 2001;29 (6):694-702.
13. Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood.* 2000;96(10):3310-21.
14. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3339-47.
15. Baxter EG, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365(9464):1054-61.
16. Kota J, Caceres N, Constantinesco SN. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2008;22(10):1828-40.

17. Kaushansky K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of JAK2: Dameshek's 54 year old speculation comes of age. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(1):5-12.
18. Panani AD. Janus kinase 2 mutations in Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: clinical implications. *Cancer Letters.* 2009;284(1):7-14.
19. Ghoreschi K, Laurence A, O'shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev.* 2009;228(1):273-87.
20. Goldman JM. A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1744-6.
21. Lindauer K, Loerting T, Liedl KR, Kroemer RT. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation *Protein Eng.* 2001;14(1):27-37.
22. Staerk J, Kallin A, Demoulin J-B, Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. *J Biol Chem.* 2005;280(51):41893-9.
23. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med.* 2005;353(2):172-87.
24. Wetzler M, Talpaz M, Van Etten RA, Hirsh-Ginsberg C, Beran M, Kurzrock R. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1925-39.
25. Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell.* 2003;14(4):1448-59.
26. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lecluse Y, Debili N, Vainchenker W, Casadevall N. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2004;32(2):179-87.

27. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature*. 2007;7(9):676-83.
28. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(13),1201-14.
29. Prchal JF, Axelrad AA. Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 1974;290(24),1382.
30. Lu X. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005;102,18962-7.
31. Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada RC. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and BCL-XL upregulation. *J Biol Chem.* 2007;282(42):30707-17.
32. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood.* 2006;107(11):4274-81.
33. Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, Gramlich JL, Neuberg DS, Podar K, et al. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J Biol Chem.* 2006;281(26):18177-83.
34. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem.* 2000;275(38):29338-47.
35. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):454-65.
36. Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, Staerk J, Ward AC, Vainchenker W, et al. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by

- suppressor of cytokine signaling 3. *Blood*. 2007;109(11):4924-9.
37. Ishii T, Bruno E, Hoffman R, Xu M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood*. 2006;108(9):3128-34.
 38. Kilpivaara O, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia*. 2008;22(10):1813-7.
 39. Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(4):1377-80.
 40. Ihle JN, Gilliland DG. Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(1):8-14.
 41. Kralovics, R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2008;22(10):1841-8.
 42. Passamonti F, Rumi E. Clinical relevance of *JAK2* (V617F) mutant allele burden. *Haematol*. 2009;94(1):7-10.
 43. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006;108(6):1865-7.
 44. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp. Hematol*. 2002;30(3):229-36.
 45. Xing S, Wanting TH, Zhao W, Ma J, Wang S, Xu X, et al. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. *Blood*. 2008;111(10):5109-17.
 46. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008;22(7):1299-1307.

47. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006;108(7):2435-7.
48. Dupont S, Masse A, James C, Teyssandier I, Lecluse Y, Larbret F, et al. The JAK2 617V4F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;110(3):1013-21.
49. Bumm TG, Elsea C, Corbin AS, Loriaux M, Sherbenou D, Wood L, et al. Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res*. 2006;66(23):11156-65.
50. Cario H, Goertler PS, Steimle C, Levine RL, Pahl HL. The JAK2V617F mutation is acquired secondary to the predisposing alteration in familial polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2005;130(5):800-1.
51. Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(1):346-52.
52. Kralovics R, Skoda RC. Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Rev*. 2005;19(1):1-13.
53. Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(5):2785-9.
54. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtman SM, Berlin NI, Wasserman LR. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol*. 1986;23(2):132-43.
55. Campbell PJ, Green AR. Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:201-8.
56. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential

- thrombocytopenia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366(9501):1945-53.
57. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, et al. The JAK2 tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol*. 2005;131(3):320-8.
 58. Campbell PJ, Scott LM, Baxter EJ, Bench AJ, Green AR, Erber WN. Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders. *Methods Mol Med*. 2006;125:253-64.
 59. Tefferi A. JAK and MPL mutations in myeloid malignancies. *Leukemia Lymphoma*. 2008;49(3):388-97.
 60. Verstovsek S, Silver RT, Cross NC, Tefferi A. JAK2V617F mutational frequency in polycythemia vera: 100%, >90%, less? *Leukemia*. 2006;20(11):2067.

