



**Universidade de
Aveiro
2010**

Departamento de Biologia

**ANDREIA GABRIELA
CARVALHO COELHO
DA SILVA**

**IMPORTÂNCIA DA MUTAÇÃO JAK2 V617F NAS
DOENÇAS MIELOPROLIFERATIVAS CLÁSSICAS**



Universidade de Aveiro
2010

Departamento de Biologia

**ANDREIA GABRIELA
CARVALHO COELHO
DA SILVA**

**IMPORTÂNCIA DA MUTAÇÃO JAK2 V617F NAS
DOENÇAS MIELOPROLIFERATIVAS CLÁSSICAS**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Margarida Lourenço, Médica Especialista no Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra- EPE e co-orientação da Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus Amores: Nuno e Mariana, pelo apoio incondicional, sempre.

o júri

presidente

Professora Doutora Adelaide Almeida
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Margarida Lourenço (orientadora)
Médica Especialista em Patologia Clínica nos Hospitais da Universidade de Coimbra-EPE

Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira (co-orientadora)
Professora Associada com Agregação do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Lénia Jorge (arguente)
Médica Especialista em Patologia Clínica nos Hospitais da Universidade de Coimbra-EPE

agradecimentos

Agradeço à Doutora Margarida Lourenço e à Doutora Maria de Lourdes a orientação científica deste estudo.

Um agradecimento especial à Dr^a Margarida Pocinho pela oportunidade que me deu de adquirir novos conhecimentos através dos seus ensinamentos, pelo seu extraordinário apoio e pela sua amizade que foram fundamentais para a realização deste estudo.

Agradeço, à Directora de Serviço do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra - EPE, Dr^a. Graça Rideiro pela oportunidade de realizar este trabalho e pela sua amizade.

Agradeço a todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Hematologia, do Serviço de Patologia Clínica, dos HUC-EPE, pelo seu apoio e incentivo.

Aos meus pais Francisco e Leontina, ao meu irmão Micael, ao meu Cunhado Pedro Silva, aos meus sogros Isidro e Isabel, aos meus avós Mário, Alexandrina e Idalina, a toda a minha família e amigos agradeço o amor, a força, a compreensão, o apoio e a confiança nas minhas capacidades.

Ao meu marido Nuno Silva e à minha filha Mariana, que são os pilares da minha vida, agradeço de todo o coração a paciência, o apoio, o incentivo e o amor que tiveram para comigo ao longo desta caminhada.

Finalmente, agradeço à Universidade de Aveiro, em particular ao Departamento de Biologia que me proporcionaram todas as condições para desenvolver o meu trabalho.

palavras-chave

Policitémia Vera, Trombocitémia Essencial, Mielofibrose Idiopática, mutação JAK2 V617F.

resumo

Os Síndromes Mieloproliferativas (SMP) são um grupo de doenças heterogêneas nas quais se verifica uma produção excessiva de células sanguíneas pelos precursores hematopoiéticos. A Policitémia Vera (PV), a Trombocitémia Essencial (TE), a Mielofibrose Idiopática (MF) e a Leucemia Mielóide Crónica (LMC) são consideradas SMP clássicas que apresentam características clínicas e biológicas comuns. Ao contrário da LMC, cuja etiologia está relacionada com a proteína constitutivamente activa BCR-ABL, o mecanismo molecular da PV, TE e MF permaneceu por muito tempo desconhecido.

O grande número de estudos respeitantes às SMP resultou em 2005 na descrição de uma mutação pontual no exão 14 do gene Janus Kinase 2 (JAK2), denominada JAK2 V617F, recorrente em pacientes com SMP clássicas BCR-ABL negativos. Esta mutação leva à activação constitutiva da proteína JAK2. Estudos recentes revelam que a mutação JAK2 V617F está presente em 83-95% de doentes com PV, 50 a 70% de doentes com TE e em cerca de 50% de doentes com MF. Os objectivos deste estudo consistem em determinar a frequência da mutação JAK2 V617F numa população de doentes dos HUC-EPE com diagnóstico de PV, TE e MF, comparar a frequência obtida com a literatura, avaliando deste modo a eficácia da metodologia usada e demonstrar que esta mutação é estatisticamente significativa nos SMP clássicos Ph-. O estudo incidiu sobre um grupo de 475 doentes aos quais foi solicitada a análise da mutação JAK2 V617F no período decorrente de Junho de 2006 e Maio de 2010. A metodologia usada consistiu na extracção de ADN genómico, seguida de uma reacção de PCR utilizando primers que permitiram a amplificação dos alelos normal e mutado, e sua subsequente identificação através de uma electroforese com posterior coloração utilizando nitrato de prata. Posterior análise dos resultados determinou uma frequência da mutação JAK2 V617F de 74%, 66% e 42% em pacientes com PV, TE e MF respectivamente. Utilizando o teste Qui-Quadrado de Pearson foi possível demonstrar que: existe uma associação entre a mutação e o sexo feminino nos doentes com PV; relacionando a mutação com a doença verificou-se que a heterozigotia tem uma forte associação com a TE enquanto que a homozigotia tem associação com a PV. Por fim estabeleceu-se uma forte associação desta mutação com as SMP Ph-, ou seja, para $\alpha=0,05$ foi obtido $P<0,001$. Para provar estatisticamente a eficácia da metodologia usada efectuou-se o teste Qui-Quadrado de Aderência no qual $X^2(\text{observado})= 4,69$, inferior ao $X^2(\text{crítico})= 5,99$. Este resultado é extremamente relevante pois determina que não existe necessidade de implementar outra técnica, que seria bastante mais dispendiosa, e no presente não seria vantajosa. Futuramente quando a terapia passar pelo uso de proteínas inibidoras de JAK2, será necessário efectuar um estudo semelhante para averiguar se a metodologia qualitativa usada é suficiente para fazer a monitorização terapêutica.

keywords

Polycythemia Vera, Essential Thrombocithemia, Idiopathic Myelofibrosis, JAK2 V617F mutation.

abstract

The Myeloproliferative Syndromes are a heterogeneous group of diseases in which there was an overproduction of blood cells by hematopoietic precursors. Polycythemia Vera (PV), the Essential Thrombocytopenia (TE), Idiopathic Myelofibrosis (MF) and Chronic Myelogenous Leukemia (CML) are classic SMP that have in common clinical and biological characteristics. Unlike the LMC, whose etiology is associated with the protein constitutively active BCR-ABL, the molecular mechanism of PV, ET and IM long still remain unknown.

The large number of studies relating to SMP led in 2005, to the description of a point mutation in exon 14 of gene Janus Kinase 2 (JAK2), known as JAK2 V617F, in patients with recurrent classic SMP Ph-. This mutation leads to constitutive activation of JAK2 protein. Recent studies shown that JAK2 V617F is present in 83-95% of patients with PV, 50 to 70% of ET patients and in 50% of patients with IM. The objectives of this study were to determine the frequency of JAK2 V617F in a patient population of HUC-EPE diagnosed with PV, ET and MF, comparing the frequency obtained with the literature, thereby assessing the effectiveness of the methodology used. The study focused on a group of 475 patients who were asked to JAK2 V617F mutation analysis in the period from June 2006 to May 2010. The methodology used consisted in a extraction of genomic DNA, followed by a PCR reaction using primers that allowed the amplification of normal and mutated alleles, and their subsequent identification by an electrophoresis and staining using silver nitrate. Further analysis of the results determined a frequency of JAK2 V617F in 74%, 66% and 42% in patients with PV, ET and IM respectively. Using the Pearson chi-square test was possible to demonstrate that: the mutation has an association with female gender in PV patients, observing the relationship between the disease and the mutation was found that heterozygosity has a strong association with TE whereas homozygosity is associated with the PV. Finally we established a strong association of this mutation with Ph-SMP, to $\alpha = 0.05$ was obtained a $P < 0,001$. To statistically prove the effectiveness of the methodology was carried out a Chi-square test where X^2 (observed) = 4.69 was lower than the X^2 (insidious) = 5.99. This result is extremely important because it determines that there was no need to implement a quantitative technique, it would be far more expensive, and this would not be advantageous. In the future when therapy over the use of protein inhibitors of JAK2, we must perform a similar study to see whether the qualitative methodology used is enough to make the therapeutic monitorization.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hematopoiese.....	1
1.2 Síndromes Mieloproliferativas.....	3
1.2.1 Policitemia Vera.....	4
1.2.2 Trombocitemia Essencial.....	4
1.2.3 Mielofibrose Idiopática.....	6
1.3 Gene JAK2.....	7
1.4 Enquadramento do tema.....	12
1.5 Objectivos.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 População estudada.....	15
2.2 Material biológico.....	15
2.3 Extração, <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR) e electroforese.....	15
2.3.1 Estudo molecular.....	15
2.3.1.1 Extração.....	16
2.3.1.2 Reacção de PCR.....	16
2.3.1.3 Electroforese e coloração do produto PCR no Phastsystem.....	17
2.4 Tratamento estatístico.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	26
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Células tronco Hematopoiéticas e progenitoras: células tronco pluripotentes da medula óssea e origem das linhagens celulares (3).....	1
Figura 2 - Hematopoiese: a matriz estromal (3).....	2
Figura 3 - Classificação das SMPs clássicas segundo William Damshek (10).....	4
Figura 4 - Localização do gene JAK no cromossoma 9 (26).	7
Figura 5 - Via de sinalização JAK-STAT (31)	8
Figura 6 - Constituição das proteínas JAK e STAT (10)	9
Figura 7 - Modelo de activação da Via de sinalização JAK/STAT (3).....	10
Figura 8 - Localização da mutaçãoV617F (10)	11
Figura 9 - JAK2: A) inactivo; B) activado pelo ligando; C) activo, devido à mutação V617F (38).....	12
Figura 10 - Caracterização da população quanto ao diagnóstico.....	19
Figura 11 - Outras informações clínicas apresentadas em percentagem.....	20
Figura 12 - Resultados JAK2 V617F obtidos no grupo de doentes com "outras informações clínicas"	20
Figura 13 - Percentagem de SMPs clássicas Ph- estudadas.....	21
Figura 14 - PV: resultados obtidos na determinação da mutação JAK2 V617F	21
Figura 15 - TE: resultados obtidos no estudo da mutação JAK2 V617F	22
Figura 16 - MF: resultados obtidos no estudo da mutação JAK2 V617F.....	23
Figura 17 - Frequência dos genótipos normal, homocigoto e heterocigoto nas 3 SMPs clássicas Ph-.....	24

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Sequência dos <i>primers</i> (Opreon Biotechnologies).....	17
Tabela II - Descrição do programa de PCR usado no estudo da mutação JAK2 V617F	17
Tabela III - Descrição do programa de electroforese usado pelo Phastsystem na detecção dos.....	18
Tabela IV - Programa de coloração seguido pelo Phastsystem.....	18

SIGLAS E ABREVIATURAS

32P -	Fósforo 32
ADN-	Acido desoxirribonucleico
AVC -	Acidentes Vasculares Cerebrais
CD	“Cluster of Differentiation”
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra acético
EPO -	Eritropoietina
G6PD -	Glucose -6-fosfato-desidrogenase
GM-CSF -	Factor estimulador de colónias de macrófago-granulócito
HUC -	Hospitais da Universidade de Coimbra
IL -	Interleucina
JAK2 -	Janus Kinase 2
JH -	Domínio homólogo JAK
LMC -	Leucemia Mieloide Crónica
MF -	Mielofibrose Idiopática
MFC -	Mielofibrose Primária Crónica
PCR -	Reacção de polimerase em cadeia
Ph -	Cromossoma Philadelphia
PIAS	Inibidores proteicos de STATs activos
PTPs	Proteínas Tirosina Fosfatases
PV -	Policitémia Vera
SH2 -	Domínio homólogo STAT
SMPs -	Síndromes Mieloproliferativos
SOCS	Supressores de citocinas sinalizadas
STAT -	Transdutor de sinal e activador da transcrição
Taq -	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE -	Trombocitémia Essencial
TEP -	Tromboembolia pulmonar
TIK2	Tirosina Quinase 2
TPO -	Trombopoietina
TVP -	Trombose venosa profunda
XCIP -	Análise da inactivação do padrão do cromossoma X

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hematopoiese

As células sanguíneas estão em constante formação através de um processo designado hematopoiese. As células estaminais pluripotentes “stem cells”, têm origem no saco vitelino do embrião, migrando posteriormente para o fígado. Assim, no feto, a hematopoiese ocorre no fígado. As células pluripotentes migram para a medula óssea, e pouco depois do nascimento o fígado deixa de ser a fonte de células sanguíneas (1).

Na hematopoiese uma célula pluripotente comum origina, após várias divisões celulares e passos de diferenciação, uma série de células progenitoras para 3 linhas celulares principais: eritróide, granulócítica-monocítica, e megacariocítica, bem como uma stem cell linfóide comum (2) (Figura 1).

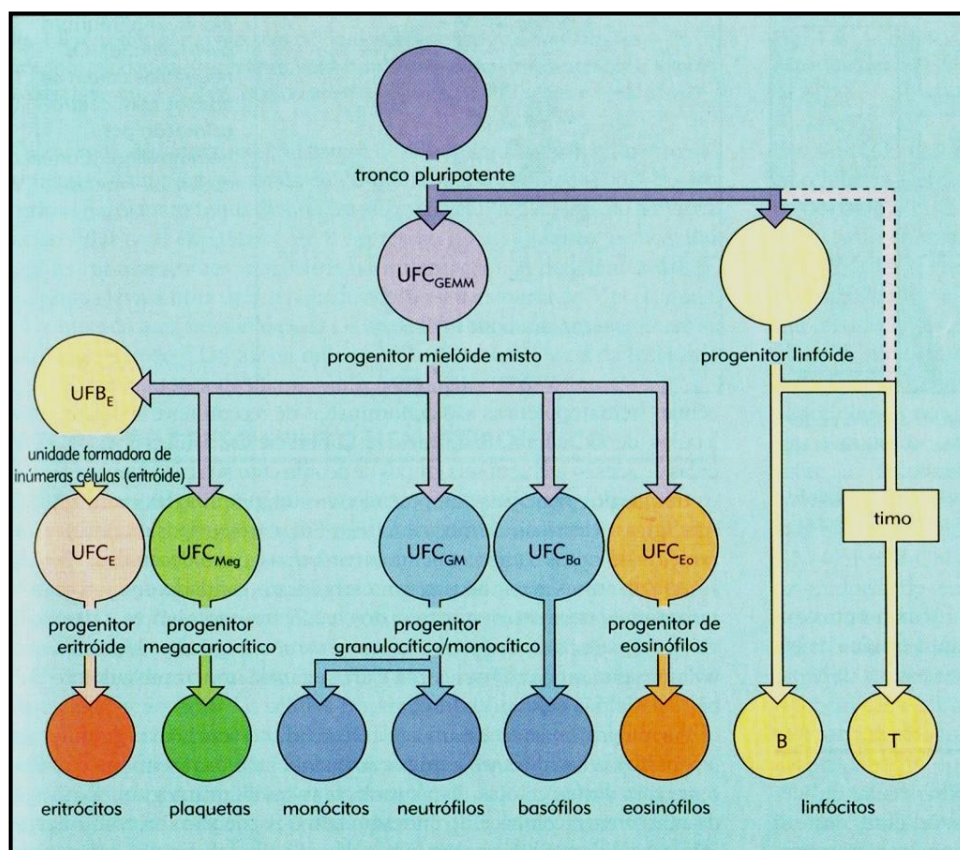


Figura 1- Células tronco Hematopoiéticas e progenitoras: células tronco pluripotentes da medula óssea e origem das linhagens celulares (3).

A *stem cell* possui a capacidade de auto-renovação, permitindo à medula óssea, em condições normais de saúde, manter constante a sua celularidade.

A medula contém uma matriz estromal que fornece o microambiente apropriado para o crescimento das *stem cell*. As moléculas de adesão e os factores de crescimento ligados às células do estroma ou à matriz extracelular fornecem locais de ligação para as *stem cells* (Figura 2) (3).

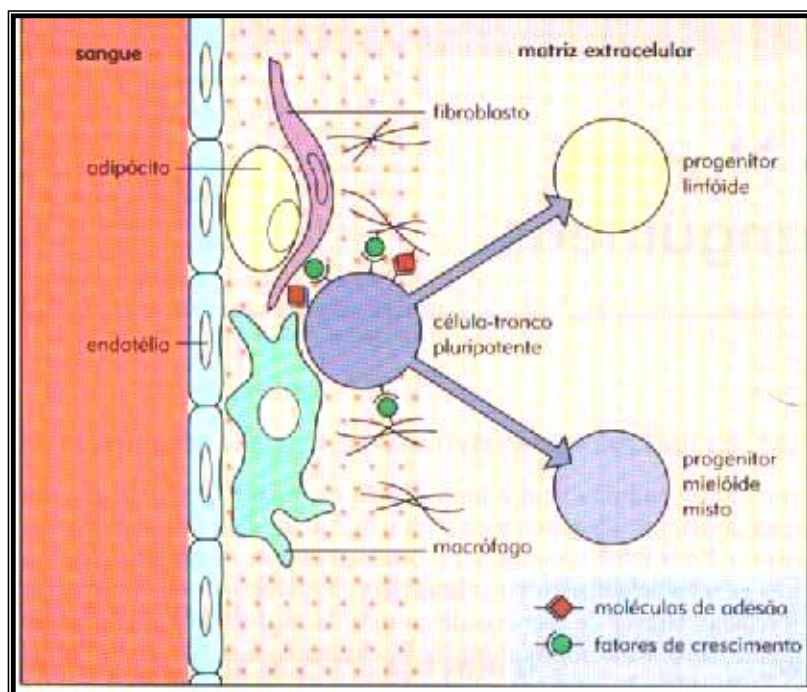


Figura 2 - Hematopoiese: a matriz estromal (3).

A hematopoiese ocorre deste modo num microambiente adequado, onde as células progenitoras são capazes de responder a factores de crescimento hematopoiético com o aumento de produção das linhas celulares sempre que necessário. O desenvolvimento destas células até ao estado de maturação total ocorre sob influência de diversos factores de crescimento, nomeadamente: IL-1 (interleucina – 1), IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos, de granulócito e de monócito. Estes factores de crescimento são hormonas glicoproteicas que estimulam a proliferação, diferenciação, e maturação das células progenitoras hematopoiéticas, evitam a apoptose e afectam a função das células sanguíneas maduras sob as quais actuam (4).

1.2 Síndromes Mieloproliferativas

Os Síndromes Mieloproliferativas (SMP) são um grupo de doenças heterogêneas nas quais se verifica uma produção excessiva de células sanguíneas pelos precursores hematopoiéticos (2, 5-7). Na prática verifica-se a proliferação de uma ou mais células da linha mieloide na medula óssea, que se traduz posteriormente em células maduras e imaturas no sangue periférico (6).

Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE), Mielofibrose Idiopática (MF) e Leucemia Mielóide Crônica (LMC) são consideradas SMP clássicas e apresentam características clínicas e biológicas comuns (2, 8). Ao contrário da LMC, cuja etiologia está relacionada com a proteína constitutivamente activa BCR-ABL (6-7), na qual citogeneticamente se observa o cromossoma Philadelphia (Ph), o mecanismo molecular da PV, TE e MF permaneceu desconhecido por muito tempo (7, 9). William Dameshek foi o primeiro a reconhecer que estas entidades deveriam ser classificadas como um conjunto de doenças mieloproliferativas fenotipicamente relacionadas (2, 10-11). São frequentemente designadas como SMP cromossoma Philadelphia negativo (Ph-) (12). Estudos baseados em isoenzimas da glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), análise da inativação do padrão do cromossoma-X (XCIP), perda da heterozigotismo do braço curto do cromossoma 9, demonstraram que estas doenças são hematologias derivadas da transformação de uma célula hematopoiética pluripotente (13-14).

Jaroslav Prchal e Arthur Axelrad, em 1974, verificaram *in vitro*, a existência de colónias de eritrócitos na ausência de citocinas exógenas, em doentes com PV, não sujeitos a terapia citorredutiva. Este fenómeno, denominado colónias eritróides endógenas, é característico da PV, sendo também observado em alguns pacientes com TE e MF (10-11).

Porém, existem também estudos que defendem a teoria de que estas 3 doenças poderão representar o mesmo, embora com manifestações clínicas diferentes (15). De facto, as SMP clássicas são caracterizadas pela existência de hematopoiese extramedular, principalmente na MF, que pode conduzir a esplenomegália, transformação em leucemia aguda, desenvolvimento de fibrose

da medula óssea com gravidade variável, e acima de tudo a episódios trombóticos e hemorrágicos (2, 16) (Figura 3).

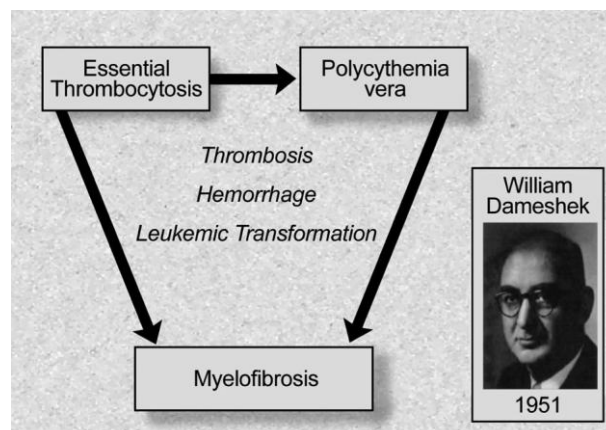


Figura 3- Classificação das SMPs clássicas segundo William Dameshek (10)

1.2.1 Policitemia Vera

A Policitemia Vera (PV) caracteriza-se pelo aumento da produção de eritrócitos, granulócitos e plaquetas. Afecta principalmente a faixa etária dos 40 a 60 anos de idade. A sua incidência segundo o padrão de população mundial é de 0,6 por 100,000 e segundo o padrão populacional europeu 0,9 por 100,000 com ratio de 1:1 entre os sexos (17). Não se conhece até agora cura efectiva para esta doença, sendo a flebotomia o pilar do tratamento (2). São igualmente usados alguns fármacos (hydroxiúreia, o interferon- α e a anagrelide) e a radiação com ^{32}P (8, 18). A característica principal desta doença depreende-se com o facto de que os precursores hematopoiéticos apresentarem uma resposta hiper-sensível a muitos factores de crescimento e citocinas, apesar do número de receptores presentes na superfície destas células ser normal, o que é sugestivo de um defeito primário numa via de sinalização comum (18).

1.2.2 Trombocitemia Essencial

A Trombocitemia Essencial é o SMP com melhor prognóstico (19). Consiste na hiperplasia da série megacariocítica da medula óssea e que cursa com trombocitose em níveis superiores a 600.000 mm^3 , esplenomegália, eventos trombóticos e/ou hemorrágicos durante a evolução da doença. A incidência, por

100,000 habitantes, tendo como padrão a população mundial e europeia é de 1,4 e 2 respectivamente, com ligeira prevalência do sexo feminino (56%) (17). Actualmente o diagnóstico da TE é mais frequente, uma vez que a contagem de plaquetas é feita por rotina em exames laboratoriais. A idade média de diagnóstico situa-se entre os 65 e 70 anos, podendo ocorrer a qualquer idade (12). Alguns pacientes são assintomáticos, outros podem apresentar distúrbios vaso-motores (exemplo: dores de cabeça, distúrbios visuais, dores atípicas no peito). As manifestações clínicas principais desta doença são a predisposição para (20):

- Episódios vasculares oclusivos envolvendo a circulação cerebrovascular, coronária e arterial periférica. As trombozes das grandes artérias representam a maior causa de mortalidade associada à doença.
- Manifestações hemorrágicas, como hematomas, equimoses, epistáxias são observadas. Também podem ocorrer hemorragias secundárias graves após cirurgia ou trauma. As hemorragias não se devem a uma falha na função plaquetar mas sim, devido à doença de Von Willebrand adquirida. Existe uma relação inversa entre os níveis do factor de Von Willebrand e a quantidade de plaquetas.

É de salientar que existem perigos acrescidos durante a gravidez, para mulheres portadoras desta doença. Contudo, o feto é alvo de maior perigo, nomeadamente: morte intra-uterina, atraso no crescimento, ruptura da placenta e parto pré-termo. A percentagem de nados vivos destas parturientes encontra-se descrita entre os 50 e os 57% (21).

O diagnóstico da doença é feito passo a passo, começando pela exclusão de outras situações patológicas que possam originar o aumento do número de plaquetas, nomeadamente trombocitose secundária, PV e MF. Após diagnóstico, os doentes são classificados em três categorias de risco, baseadas principalmente na predisposição para episódios trombohemorrágicos: pacientes de alto risco, risco moderado e baixo risco. Isto deve-se ao facto de não haver um fármaco que leve à cura efectiva ou à prevenção da evolução clonal. Deste modo, a terapia é efectuada com o intuito de prevenir, ou mais raramente tratar os incidentes trombo-hemorrágicos (12, 20). As intervenções terapêuticas cingem-se

na administração de anti-agregantes e ou citorredução de plaquetas (8, 12). A esperança média de vida destes doentes é praticamente normal, comparativamente com uma população saudável (2, 12).

1.2.3 Mielofibrose Idiopática

A Mielofibrose, foi inicialmente descrita por Gustav Hueck em 1879, um Físico Alemão, que notou a presença de fibrose da medula óssea e hematopoiese extramedular em doentes com mielofibrose primária (10). Os locais mais frequentes de hematopoiese extramedular são o fígado, baço e nódulos linfáticos (22-23). O envolvimento de outros locais como cavidade intra-torácica, rim e tiróide também têm sido relatados. No entanto, a compressão da espinha dorsal, resultante do envolvimento da dura mater, raramente foi descrito entre os 2 a 20 anos após o diagnóstico da mielofibrose. A mielofibrose apresentada como compressão da espinha dorsal é também muito rara (22).

Normalmente, esta doença é diagnosticada entre a quinta e sexta década de vida. Tanto a PV como a ET e a MF podem evoluir para mielofibrose primária crónica (MFC) mas verifica-se que 90% dos casos têm origem na MF (24). A incidência na população mundial e europeia é de 0,3 e 0,5 por 100,000 habitantes respectivamente, com predomínio masculino de 70% (17). É uma doença progressiva e não apresenta cura. A sua patogénese envolve uma célula progenitora hematopoiética pluripotente que induz o depósito de fibrina e colagénio na medula óssea através da libertação de factores angeogénicos. As características clínicas principais são anemia progressiva, leucocitose ou leucopenia, aumento do nível de circulação de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺, fibrose da medula óssea com neovascularização e esplenomegalia acentuada com hematopoiese extramedular (25).

A sobrevida média dos doentes após o diagnóstico, é 3,5 – 5,5 anos apesar da variação entre indivíduos ser grande. Nos casos mais graves pode haver transformação em Leucemia Aguda. Têm sido desenvolvidos vários sistemas de prognóstico para servir de referência a uma terapia adaptada ao risco. As abordagens terapêuticas existentes não são eficazes ao ponto de reduzir totalmente a mortalidade (24). Assim, a terapia é administrada com o intuito de

suporte (8, 24). O tratamento convencional baseia-se em androgéneos, corticosteroides e agentes quelantes que promovem o aumento de qualidade de vida, aliviando a sintomatologia e mantendo os valores das células do sangue periférico sobre controlo. Quando o diagnóstico é feito em doentes assintomáticos, é razoável não efectuar qualquer tipo de terapia até surgirem os primeiros sintomas ou haver indícios da progressão da doença (24).

O grande número de estudos respeitantes às SMPs resultou em 2005 na descrição de uma única mutação no gene JAK2, recorrente em pacientes com SMPs clássicas, BCR-ABL negativas (8-9, 11, 14).

1.3 Gene JAK2

O gene Janus Kinase 2 fornece instruções para a produção de uma proteína que promove o crescimento e proliferação celular. Esta proteína faz parte de uma via de sinalização designada via JAK/STAT que transmite sinais químicos do exterior da célula para o núcleo, sendo particularmente importante no controlo de produção de células sanguíneas a partir de *stem cells* hematopoiéticas (2).

O gene JAK2 encontra-se localizado no braço curto do cromossoma 9 (9), mais concretamente 9p24 (10) (Figura 4).

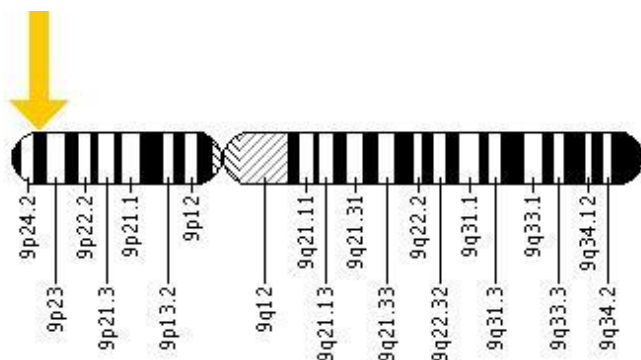


Figura 4 - Localização do gene JAK no cromossoma 9 (26).

A proteína JAK2, pertencente à família das Janus Quinases (11), é também uma tirosina-cinase, fosforilada em resposta à acção de diversas citocinas, activando assim diferentes vias de sinalização intracelular e participando no processo de transdução de sinal (2, 9) (Figura 5). Apresenta mesmo um papel principal na

transdução de sinal de múltiplos receptores hematopoiéticos de crescimento (27). JAK2 é activado através da ligação de ligandos citocinas tipo 1, que incluem: Eritropoietina (EPO), Factor estimulador de colónias de macrófago-granulócito (GM-CSF) e Trombopoietina (TPO) ao receptor (2, 6). Esta ligação tem como resultado a produção de eritrócitos, macrófagos/granulócitos e plaquetas respectivamente (28). A via de sinalização JAK/STAT é uma das várias cascatas pleotrópicas usadas para traduzir múltiplos sinais de desenvolvimento e hemostase em animais, desde humanos a insectos (29). A activação da proteína JAK estimula a proliferação celular, diferenciação, migração celular e apoptose (29-30). Estes eventos celulares são críticos para a hematopoiese, desenvolvimento imunitário, desenvolvimento de glândulas mamárias e lactação, adipogénese, crescimento sexual dimórfico, entre outros processos. Previsivelmente, mutações que reduzam a actividade da via JAK/STAT afectam estes processos. Por outro lado, mutações que constitutivamente activem ou levam a uma falha na regulação desta via causam doenças inflamatórias, eritrocitose, gigantismo, e vários tipos de leucemias (29).

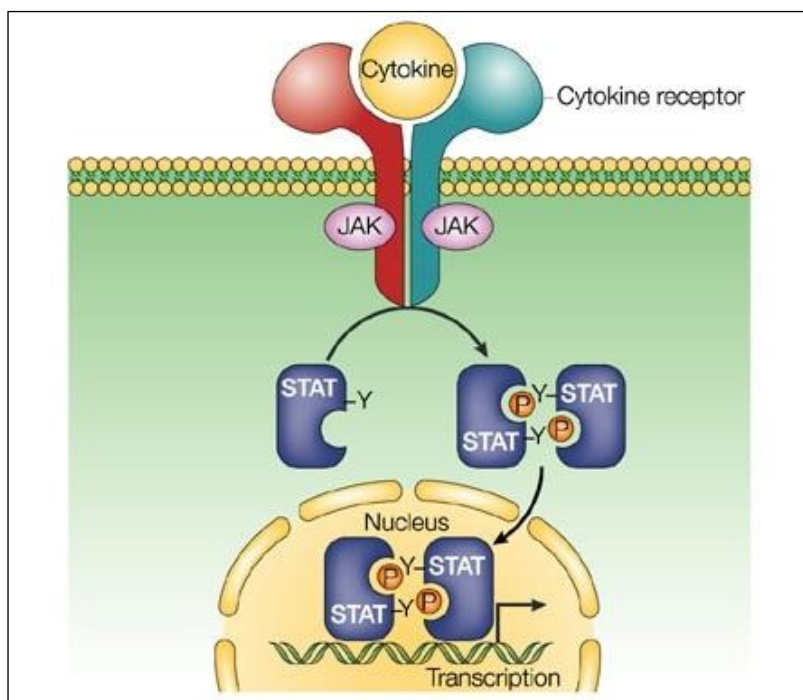


Figura 5 - Via de sinalização JAK-STAT (31)

O sistema JAK-STAT compreende 3 elementos principais: receptor, proteínas JAK e os transdutores de sinal e activadores da transcrição (STAT) (3, 32) (Figura 5). Nos mamíferos, a família JAK compreende 4 membros: JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 (29). Cada JAK cinase apresenta 7 domínios homólogos JAK. O domínio JH1, no C-terminal contém o domínio catalítico, enquanto o N-terminal JH7 foi demonstrado como essencial para a associação com os receptores de citosinas (10). O domínio pseudocinase (JH2) é significativamente homólogo ao domínio cinsase (JH1), embora sem actividade catalítica (6, 11, 33) (Figura 6).

As proteínas STAT são, como o próprio nome indica, factores de transcrição citoplasmáticos latentes, só activos após serem recrutados para um complexo receptor activo. Posteriormente estas proteínas activas são translocadas para o núcleo para participarem na expressão genética (32). Cada STAT pode ser dividido em 5 domínios estruturalmente e funcionalmente conservados. A porção amino-terminal da proteína consiste em 2 domínios pouco descritos, enquanto os cerca de 125 aminoácidos amino-terminais são domínios bem conservados e estão descritos por regularem a translocação nuclear e promover cooperatividade na ligação ao ADN (34) (Figura 6).

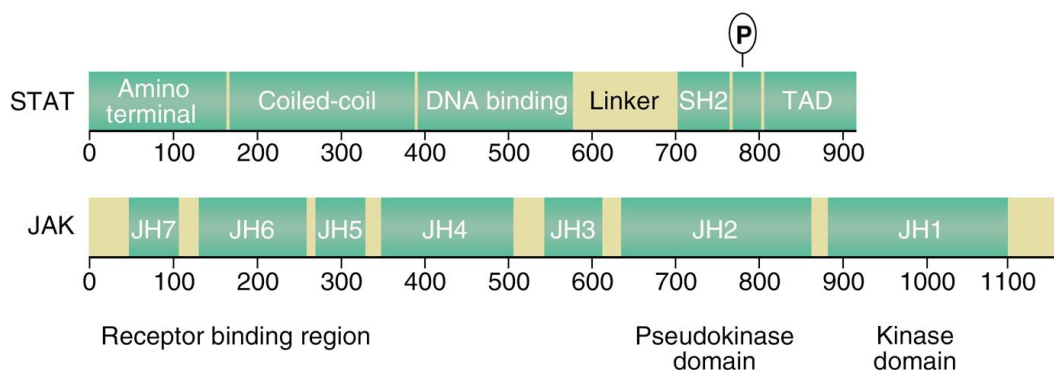


Figura 6- Constituição das proteínas JAK e STAT (10)

Apesar dos estudos intensos nesta década terem levado a um entendimento geral de como a maioria dos receptores de citocinas activam a via de sinalização JAK/STAT, o exacto mecanismo molecular da activação ainda não é completamente conhecido, continuando a ser uma área activa de investigação.

Pensa-se que JAK2 é activado através de uma mudança configuracional no receptor que permite *trans* e/ou auto-fosforilação das duas moléculas JAK2 ligadas. Esta fosforilação da tirosina ligando-dependente ocorre principalmente na Tyr 1007. JAK2 activado, fosforila então resíduos específicos de tirosina nas caudas citoplasmáticas do receptor, criando locais de ancoramento para os domínios SH2, contidos nas proteínas STAT. Uma vez ligado aos receptores, STATs são eles próprios fosforilados por JAK2 nos resíduos de tirosina. Subsequentemente, STAT fosforilados formam dímeros que são translocados para o núcleo, local onde regulam a transcrição (3, 11, 35) (Figura 7).

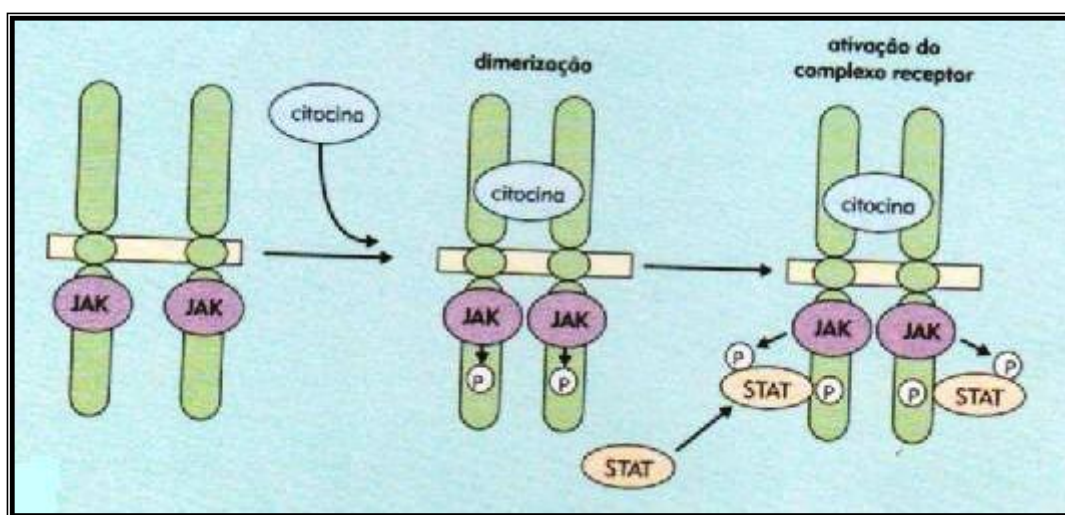


Figura 7- Modelo de activação da Via de sinalização JAK/STAT (3).

Estão identificados mecanismos de regulação negativa desta via que controlam a sua activação, que incluem: degradação endossómica dos complexos JAK/Receptor, efeitos dominantes negativos de várias variantes STAT (32), proteínas da família PIAS, proteínas da família SOCS e proteínas tirosina fosfatases PTPs (29).

A PV, TE e MF são únicas no seio das doenças mieloproliferativas, uma vez que partilham uma mutação que leva à activação constitutiva de JAK2 (2, 6, 8, 30). Trata-se de uma mutação pontual, no exão 14 do gene JAK2 (2), o que resulta na substituição de uma valina por uma fenilalanina (V→F) no codão 617 da proteína codificada (JAK2 V617F). Esta mutação encontra-se localizada no domínio homólogo 2 (JH2), domínio pseudocinase (Figura 8) (6-7, 9, 11).

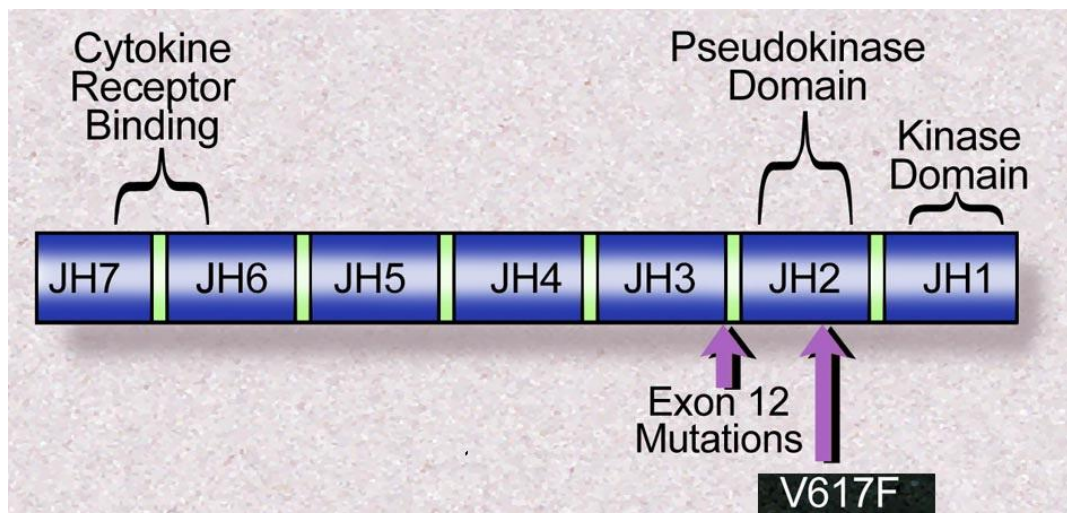


Figura 8- Localização da mutação V617F (10)

O gene JAK2 não se encontra presente nas linhas germinais, consistente com a noção que é uma mutação adquirida como uma doença alélica somática no compartimento hematopoiético (7, 10-11). Em 2006, François e colaboradores, realizaram um estudo em doentes com PV e MF, no qual demonstram que esta mutação ocorre num precursor hematopoiético de origem linfomielóide. Assim, o fenótipo da doença está provavelmente relacionado com a vantagem proliferativa dada essencialmente á serie mieloide, traduzindo-se numa doença mieloproliferativa e não numa doença linfoproliferativa (14). Em estudos anteriores verificou-se que a expressão da cinase JAK2 (V617F) *in vitro* demonstrou uma activação constitutiva e factor de crescimento independente, e que a expressão de JAK2 V617F num modelo transplantado de medula óssea de rato teve como consequência policitémia e mielofifrose no rato receptor (36-37). Estes dados sugerem que a JAK2 V617F é uma tirosina cinase constitutivamente activa (7, 11, 33). A deleccção do domínio JH2, na proteína normal, resulta no aumento da actividade da actividade cinase JH1, o que pressupõe que este regula negativamente a actividade cinase de JH1 (6-7, 33). A mutação V617F no domínio regulador JH2 liberta o domínio cinase JH1 da inibição (11), levando a uma activação constitutiva mesmo na ausência de ligando (2) (Figura 9).

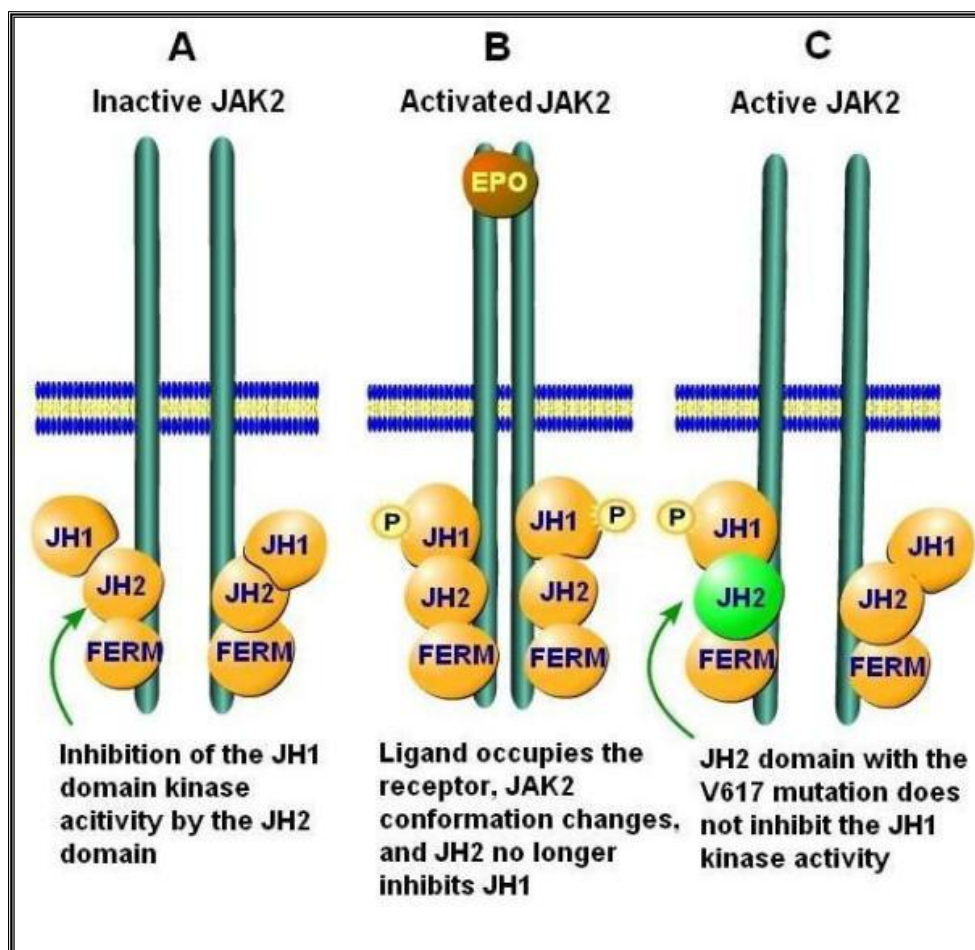


Figura 9- JAK2: A) inactivo; B) activado pelo ligando; C) activo, devido à mutação V617F (38)

1.3 Enquadramento do Tema e sua Justificação

Estudos recentes revelam que a mutação JAK2 V617F está presente em 83% a 95% de pacientes com PV, em cerca de 50% a 70% de pacientes com TE e 50% de doentes com MF (2, 6, 8, 17, 30). Apesar de esta mutação não ser exclusiva destes SMP clássicos é onde a sua frequência apresenta relevo estatístico (2, 11). Este facto levanta a questão de como é que uma mutação pode desencadear 3 doenças, que embora relacionadas apresentam fenótipos distintos (2, 9). Actualmente são propostas 3 hipóteses (6, 9, 33):

- O fenótipo da doença depende da natureza da célula progenitora afectada pela mutação
- O nível de actividade cinase gerada pela mutação determina o perfil da doença

- Eventos alternativos ou adicionais podem ser responsáveis pela variedade clínica ou mesmo preceder a mutação.

Esta última hipótese tem sido a mais fundamentada, uma vez que a mutação não se encontra presente em todos os doentes, nomeadamente nos que apresentam historial familiar comum (2, 39). Outras mutações, nomeadamente no exão 12 da proteína JAK2 foram já identificadas em doentes com JAK2 V617F negativos, embora sem relevo estatístico (2, 10).

O método usado neste estudo faz uma análise qualitativa, ou seja, determina a existência ou não do alelos normal e mutado. Porém, não permite a quantificação dos mesmos. Existem diversas técnicas implementadas no mercado, algumas das quais permitem também a quantificação, embora sejam mais dispendiosas. Existem também estudos comparativos das diversas tecnologias (6, 11, 18, 28, 33, 40) dos quais se depreende que as dispendiosas técnicas que recorrem à utilização de sondas para quantificação são mais sensíveis.

Por ser de momento a mutação conhecida com maior evidência nestas doenças, foram realizados estudos no sentido de desenvolver inibidores da proteína JAK2 V617F (2, 8, 24, 35-36). No ano corrente Marubayashi e colaboradores, demonstraram laboratorialmente que, o inibidor (PU-H71) é um potencial alvo terapêutico para doentes com a mutação JAK2 V617F. A utilização deste antagonista em ratos promoveu: a degradação da proteína JAK, inibição a via de sinalização JAK-STAT, a normalização dos valores das células sanguíneas e aumentou a longevidade dos modelos com SMPs através de doses que não degradavam a proteína JAK em tecidos normais nem causam toxicidade. Outro aspecto relevante é o facto deste inibidor diminuir a homozigotia do alelo mutado (8). O somatório de todos estes factos faz deste tema um tema actual, de interesse e ainda em desenvolvimento.

Objectivos

Este trabalho tem como objectivos:

- determinar a frequência da mutação JAK2 V617F em doentes com doenças mieloproliferativas clássicas TE, PV e MF. A LMC, como já referido anteriormente tem como marcador genético o cromossoma Philadelphia;
- averiguar, dado o elevado número de amostras e de não existir um estudo semelhante nos HUC-EPE, se os resultados obtidos se encontram de acordo com a literatura;
- avaliar a eficácia da metodologia;
- demonstrar que esta mutação é estatisticamente significativa nos SMP clássicos Ph-.

2. Material e Métodos

2.1 População estudada:

O estudo incidiu sobre um grupo de 475 doentes, seguidos nas consultas externas dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC-EPE), aos quais foi solicitado a análise da mutação JAK2 V617F, no período decorrente de Junho de 2006 a Maio de 2010. A média de idades dos doentes situou-se nos 60,3 (SD= ±17,82) anos com um máximo e mínimo de 94 e 16 anos respectivamente, sendo proporção a entre sexo o feminino masculino de 1:1. A componente laboratorial foi realizada no Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos HUC-EPE, com consentimento da Directora de Serviço.

2.2 Material Biológico

O material biológico utilizado para a análise da mutação JAK 2 V617F foi sangue periférico colhido por punção venosa e transferido para um tubo de 3,0 mL com EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) da Vacuette.

Após a colheita os tubos foram conservados a -20°C até ao processamento da extracção de ADN.

2.3 Extracção, Reacção de polimerização em cadeia (PCR) e Electroforese

Os procedimentos relativos às técnicas de extracção, PCR e electroforese foram desenvolvidos a partir dos protocolos descritos no Laboratório de Hematologia dos HUC-EPE. A extracção e técnica de PCR seguiram as especificações da Quiagen®, a electroforese e coloração, com vista à interpretação dos resultados, os princípios da Amersham Biosciences®.

2.3.1 Estudo molecular

Para realizar o estudo da mutação JAK 2 V617F, procedeu-se à extracção de ADN das amostras de sangue periférico, seguindo-se uma electroforese em gel de agarose, a fim de avaliar a eficiência da extracção. Posteriormente, efectuou-se uma reacção de PCR utilizando primers que amplificam a sequência normal (229bp), mutada (279bp) e um fragmento com 436bp correspondente a um

controlo interno positivo da reacção (6). Por fim realizou-se uma electroforese e posterior coloração do gel com nitrato de prata.

2.3.1.1 Extracção de ADN

A extracção de ADN foi realizada no BioRobot EZ1 da QUIAGEN®, usando o EZ1 DNA Blood 350µl Kit. Todos os reagentes e material necessário ao processo foram fornecidos pelo Blood DNA 350µL Kit.

Utilizou-se para cada amostra um volume inicial de sangue total de 350 µL para um volume de eluição de 100 µL.

A eficácia do processo de extracção foi avaliada através de electroforese, em gel de agarose 0,8%, numa tina de electroforese Digel® (DH14). Para tal, pesaram-se 0,4g de agarose (Amersham Pharmacia Biotech AB®) que foram dissolvidos em 50,0 mL de tampão Tris-acetato.

A visualização do fragmento de ADN foi efectuada através de fluorocromo fluorescente GelRed (Biotium®) incorporado no gel. Na preparação das amostras para a electroforese pipetou-se para cada uma 7 µL de tampão Tris-Acetato-EDTA e 2 µL de ADN. Utilizou-se o marcador padrão λ (Quiagen). A electroforese decorreu durante 30 minutos a 90 volts, após o qual foi visualizado o resultado no transluminador (GeneBox).

2.3.1.2 Reacção de PCR

Para a técnica de PCR utilizou-se Taq PCR Master Mix Kit (1000 U) (Quiagen). Esta Master Mix contém Taq DNA Polymerase, um tampão único PCR Quiagen que minimiza os requisitos de optimização da reacção, e dNTPs. (WWW.qiagen.com). Foram utilizados 4 *primers*: F0, R0, Fwt e Rmt, cujas sequências são apresentadas na tabela I Os *primers* F0 e R0 flanquearam o exão 12 no gene JAK2 amplificando uma banda controlo presente em todas as amostras. A ligação dos *primers* Fwt e R0 ao ADN resultou na amplificação do alelo normal. O alelo mutado foi detectado devido à amplificação do fragmento resultante da ligação dos *primers* R0 e Rmt ao ADN alvo (6).

Os *primers* para a detecção dos alelos JAK2 e JAK2 V617F foram adquiridos à Operon® e reconstituídos em água bidestilada (Braun®), de modo a obter uma

concentração final de 100µM. Prepararam-se alíquotas que foram armazenadas a -20°C.

Tabela I - Sequência dos *primers* (Opreon Biotechnologies)

<i>Código</i>	<i>Sequência 5' - 3'</i>
F0	TCCTCAGAACGTTGATGGCAG
R0	ATTGCTTTTCCTTTTTCACAAGAT
Fwt	GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG
Rmt	GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA

Para cada grupo de amostras efectuou-se uma mistura de reacção na qual foram adicionados 10,68 mL de água bidestilada, 12,5 mL de *Master Mix*, 0,15 µL de F0, Rwt e Fwt *primers* e 0,18 µL R0 *primer*, por amostra. Após homogeneização distribuiu-se 23,75 µL desta mistura por eppendorf ao qual se adicionou 1,25 µL de amostra. Em todas as reacções foi elaborado um controlo negativo contendo 23,75 µL da mistura de reacção e 1,25 µL de água bidestilada.

As amostras foram colocadas no termociclador PCRExpress (HYBAID) e seguiu-se o programa A-17 (Tabela II).

Tabela II - Descrição do programa de PCR usado no estudo da mutação JAK2 V617F

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)
1	94	180
30	94	30
	70	30
	72	60
1	72	300
1	4	∞

2.3.1.3 Electroforese e coloração do produto de PCR no Phastsystem

Utilizou-se o gel de agarose homogéneo a 12,5% (Pharmacia Biotech®). Em cada electroforese fez-se correr o marcador de peso molecular ØX174 DNA-HaeIII Digest (BioLabs®). Por amostra pipetaram-se 2 µL de produto de PCR

adicionados a 2 µL de tampão Tris-Acetato-EDTA. O aplicador de electroforese usado foi 8x1 µL (Pharmacia Biotech®). O programa de electroforese (Tabela III) seguido pelo aparelho tem a duração aproximada de 25 minutos, terminando quando o tampão Tris-Acetato-EDTA chega ao ânodo.

Tabela III - Descrição do programa de electroforese usado pelo Phastsystem na detecção dos alelos JAK2 e JAK2 V617F.

Aplicador de amostra desce a		1.1	0000Vh		
Aplicador de amostra sobe a		1.2	0000Vh		
Passo 1.1	100V	7mA	1.0W	15°C	10Vh
Passo 1.2	300V	10mA	2.0W	15°C	40Vh

Os géis foram corados no módulo de coloração do aparelho Phastsystem utilizando o PhastGel DNA Silver Staining Kit (Pharmacia Biotech®). Destes reagentes apenas o revelador foi preparado antes da coloração, adicionando-se 80 mL de carbonato de sódio, 80µL de formaldeído e 80 µL de tiosulfato.

Tabela IV - Programa de coloração seguido pelo Phastsystem

Passo	Reagente	Tempo (min.)	Temperatura (°C)
1	Solução fixadora	8	50
2	Corante	10	50
3	Água destilada	1	25
4	Revelador	4	30
5	Solução STOP	5	50

Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do Microsoft Excel 2007 no que respeita á apresentação e organização da base de dados e na elaboração de gráficos, e do Programa Estatístico SPSS versão 18.0 para o tratamento estatístico dos dados, nomeadamente a utilização do teste Qui-Quadrado de Aderência e Qui- Quadrado de Pearson.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 475 doentes contabilizados, verificou-se que efectivamente 58% das amostras estudadas pertenceram a doentes com diagnóstico de um dos Síndromes Mieloproliferativos Clássicos (Figura 10). Desta percentagem, só 2% dizem respeito a doentes com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crónica, uma vez que o marcador genético desta doença é o cromossoma Philadelphia (Ph). Os restantes 56% encontram-se distribuídos por: TE, PV e MF, nos quais como está descrito na literatura, a TE apresenta uma maior incidência seguida da PV e num valor quase residual a MF (2).

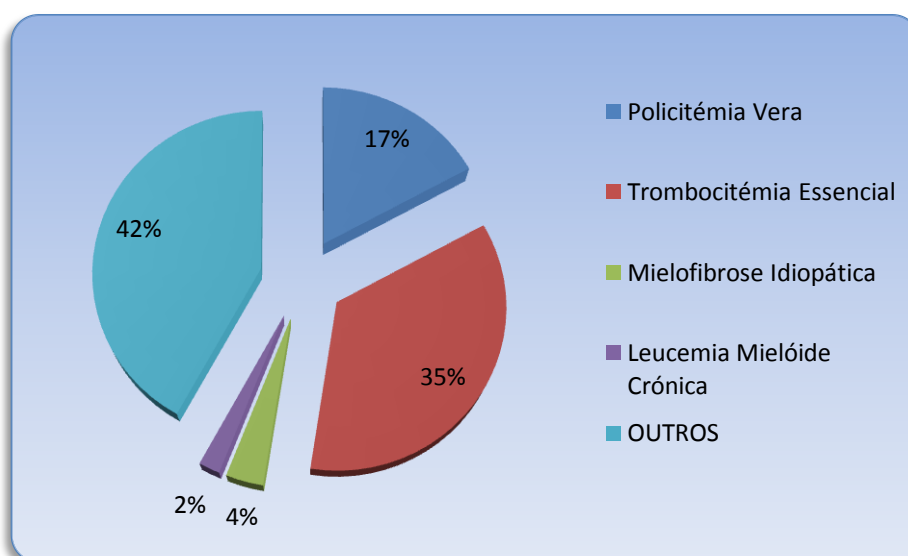


Figura 10- Caracterização da população quanto ao diagnóstico

Os outros 42% pertencem a amostras de doentes com diagnósticos, ou manifestações clínicas sugestivas de SMP clássicos (Figura11).

Como descrito anteriormente, doentes com poliglobulia são sugestivos de PV. Quando existem episódios de trombofilia, trombocitose, acidentes vasculares cerebrais (AVC), tromboes venosas profundas (TVP), tromboembolias pulmonares (TEP) pode-se suspeitar de TE. A leucocitose ou leucopenia, anemia e púrpura trombocitopénia idiopática enquadram-se no perfil da MF. Naturalmente, todas estas evidências não podem ser avaliadas isoladamente, tornando-se fundamental o estudo do quadro clínico do doente, numa perspectiva global.

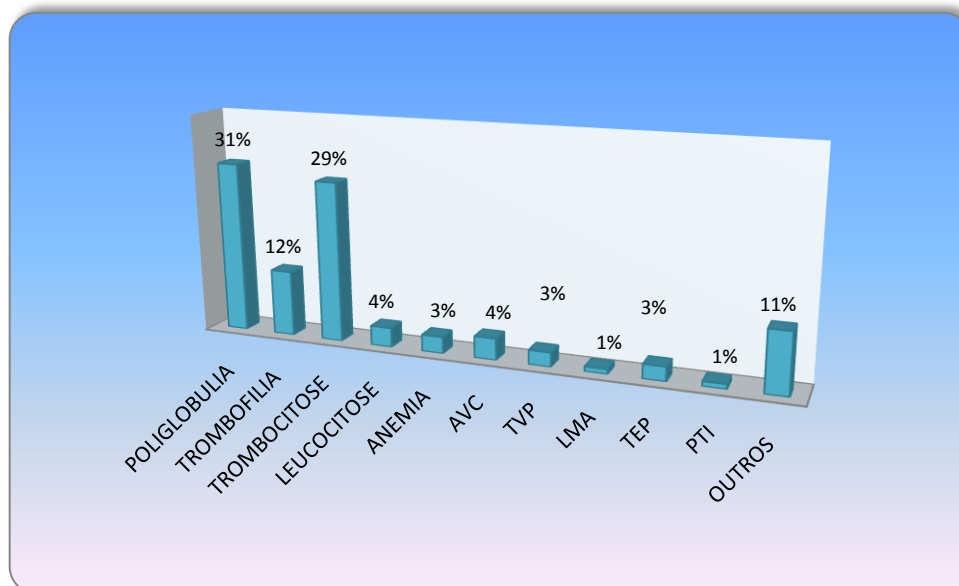


Figura 11- Outras informações clínicas apresentadas em percentagem

Deste conjunto de amostras obteve-se 96% de resultados normais no estudo da mutação JAK2 V617F (Figura 12), o que de certo modo justifica a não confirmação de um diagnóstico de SMP, apesar de, como se encontra descrito na literatura, nem todos os doentes com SMP clássicos Ph-, serem JAK2 V617F positivos (6, 11, 27). Torna-se no entanto evidente que o estudo desta mutação é um importante auxiliar de diagnóstico.

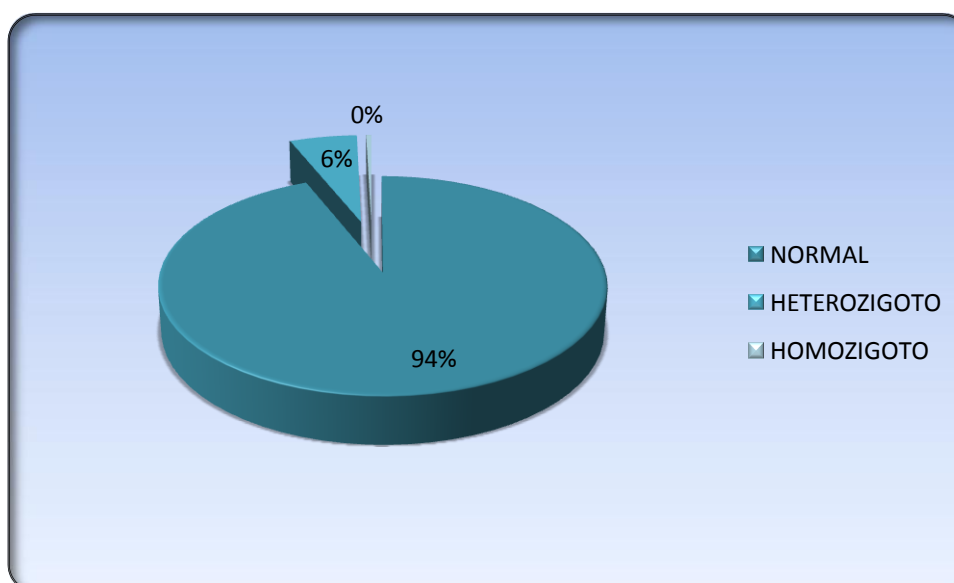


Figura 12- Resultados JAK2 V617F obtidos no grupo de doentes com "outras informações clínicas"

Após uma avaliação global dos resultados, segue-se uma análise mais pormenorizada de cada SMP clássica Ph-, nomeadamente: PV, TE e MF (Figura 13).

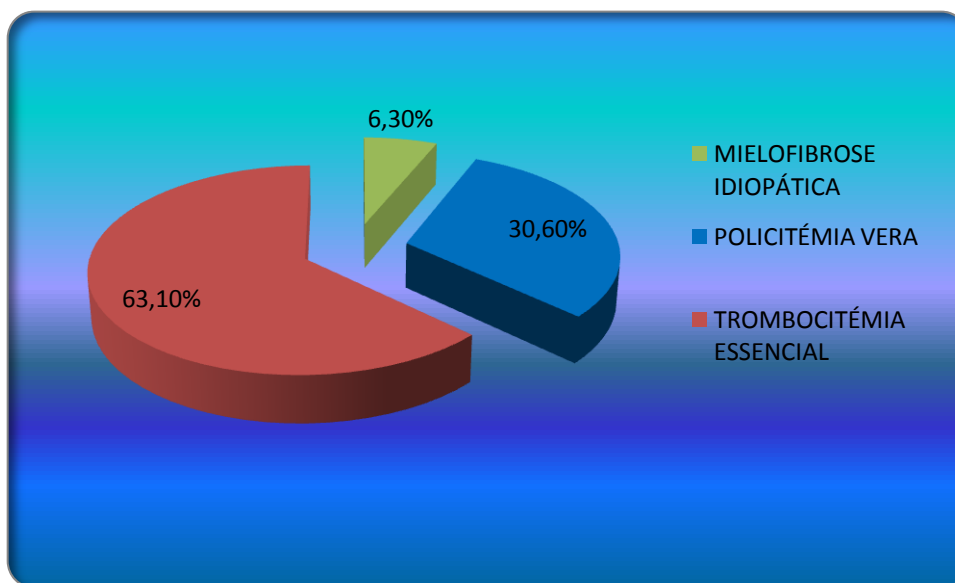


Figura 13- Percentagem de SMPs clássicas Ph- estudadas

Nos doentes portadores de Polictémia Vera foram obtidos os seguintes resultados: 48% heterozigotos, 26% homozigotos e 26% de doentes sem a mutação em estudo.

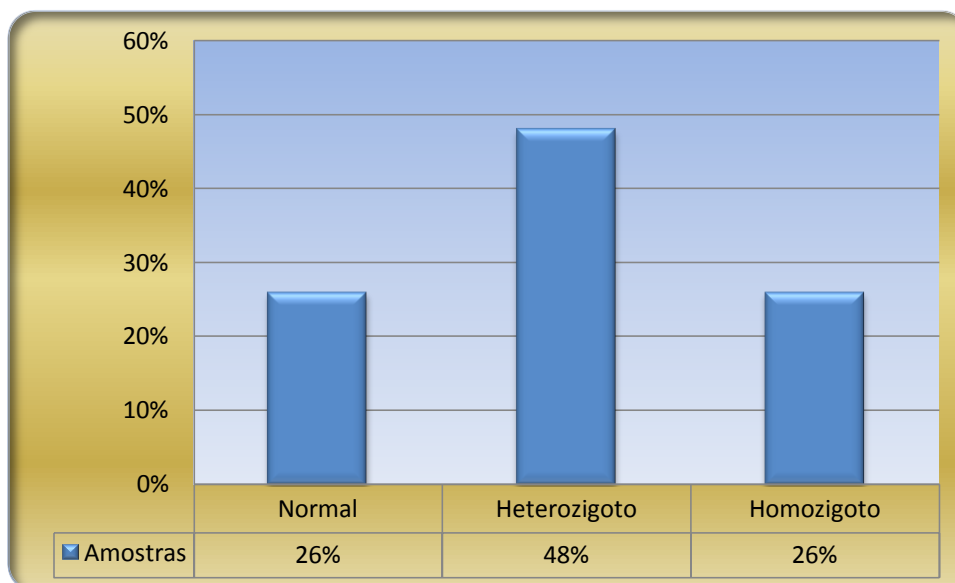


Figura 14- PV: resultados obtidos na determinação da mutação JAK2 V617F

Dos doentes estudados a percentagem de sexo feminino/masculino correspondeu a 49% e 51% respectivamente, com idades compreendidas entre os 25 e 91 (média de 68,86). Das 92 amostras estudadas 74% são JAK2 V617F positivas (Figura 14), enquanto a frequência descrita na literatura varia de 83 a 95% (2, 18). Esta evidência pode ser devida à utilização de ADN genómico, uma vez que um estudo realizado em 2005 apontou para uma maior sensibilidade da análise em ADN complementar (18).

A Trombocitémia Essencial representa o diagnóstico mais evidente no presente estudo, com uma percentagem de 63,1%. A população estudada apresenta uma média de idades de 65 anos, na qual o doente mais jovem tinha 18 anos e o mais velho 94. O sexo feminino apresenta uma irrelevante prevalência de 56%. Analisando o gráfico correspondente aos resultados obtidos no estudo da mutação JAK2 V617F, verificou-se que: 67% das amostras eram JAK2 V617F positivas e destas, 61% heterozigotas para a mutação (Figura 15), semelhante ao descrito por Jones, A. em 2005 (6) e Won, H. e colaboradores em 2009 (30). Foi demonstrado, esta prevalência de genótipo é estatisticamente significativa. Para este efeito, calculou-se o Qui-Quadrado de Pearson no qual se obteve um valor de significância inferior a 0,001 ($P < 0,001$), comprovando esta relação.

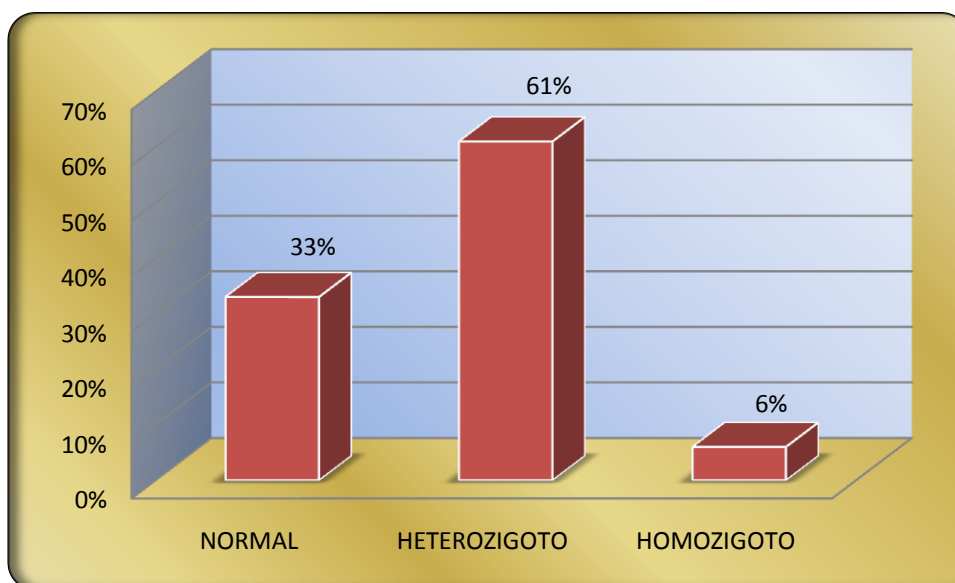


Figura 15- TE: resultados obtidos no estudo da mutação JAK2 V617F

Por fim, a análise da Mielofibrose Idiopática mostrou que embora apenas tenham sido estudados 19 doentes com este diagnóstico, os resultados obtidos também estão de acordo com a literatura (6, 17, 27). De facto, tal como descrito na literatura, nos 19 doentes estudados com este diagnóstico, verificou-se predomínio do sexo masculino de 68%, comparável aos 70% relatados por Girodon e colaboradores (17). A média de idades da população situa-se nos 70 anos, com um máximo e mínimo de 93 e 46 respectivamente. Valores um pouco acima aos descritos por Yi e colaboradores em 2006 (24).

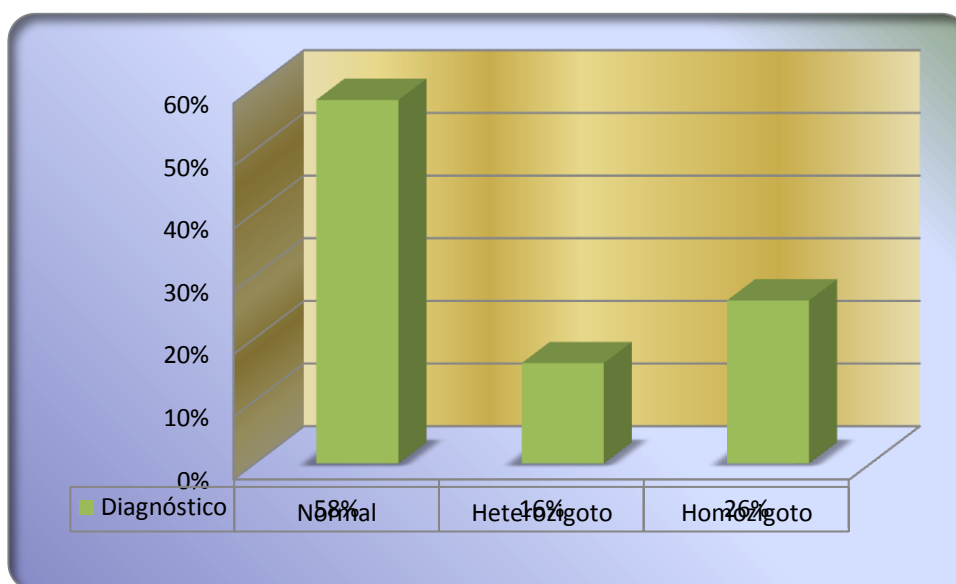


Figura 16- MF: resultados obtidos no estudo da mutação JAK2 V617F

De acordo com a figura 16 observa-se que 42% dos doentes estudados com Mielofibrose são portadores da mutação JAK2 V617F, valores também comparáveis aos descritos por Spivac no ano decorrente (2). Observou-se igualmente uma prevalência de homozigotos, mas que não revelou ser estatisticamente significativa (Figura 17).

A análise estatística dos resultados obtidos para a mutação JAK2 V617F, utilizando o teste Qui-Quadrado de Pearson, revelou também que:

- nos SMP Ph- a presença da mutação é estatisticamente significativa na faixa etária superior a setenta anos e por outro lado que a ausência de mutação é estatisticamente significativa em idades inferiores a 40 anos. Estes valores têm

como base 3 grupos etários (<40, 40-69 e ≥70), obteve-se $P= 6,53E^{-17}$, para 4 graus de liberdade.

- Existe uma relação entre a mutação JAK2 V617F e o sexo feminino dos doentes com PV pois obteve-se um valor de significância de 0,005, para 2 graus de liberdade no cruzamento destes dados. No entanto não se observou qualquer referência a esta relação na bibliografia consultada.
- Existe uma relação estatisticamente relevante entre a PV e o génotipo homozigoto, e entre a TE e o génotipo heterozigoto, tal como foi descrito por Spivac e colaboradores (2) (Figura 17).

Levine e colaboradores, descreveram a homozigotia como perda do heterozigotismo devido à recombinação mitótica do cromossoma 9 (9p24) (7, 33). Este facto pode explicar o agravamento do fenótipo dos doentes quando uma Trombocitémia Essencial evolui para Policitémia Vera ou Mielofibrose Idiopática (10).

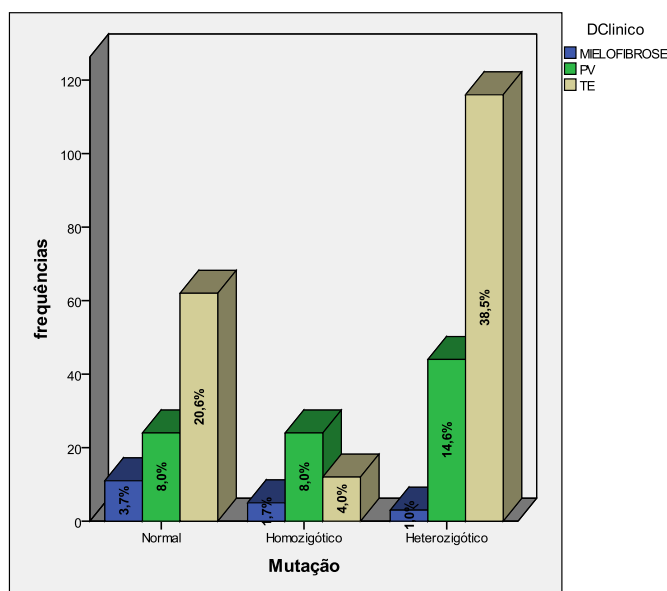


Figura 17- Frequência dos genótipos normal, homozigoto e heterozigoto nas 3 SMPs clássicas Ph-

- A mutação JAK2 V617F apresenta relevância estatística nestas 3 doenças, ou seja para 4 graus de liberdade obteve-se um Qui-Quadrado de 32,672 ($P < 0,001$). Este resultado justifica a realização desta análise, uma vez que pode

ser determinante em doentes com suspeita ou diagnóstico de SMPs Ph- (2, 7, 11, 16, 27, 41).

Por fim, os resultados obtidos na determinação da mutação JAK2 V617F nos 3 SMPs clássicos estudados, comparados com os descritos na literatura (2, 6-7, 10, 33), sugerem que a metodologia usada, apesar de não quantificar os alelos, é eficaz. Esta suposição foi comprovada estatisticamente através do teste Qui-Quadrado de Aderência (no qual, para $\alpha=0,05$, $X^2_{(observado)} = 4,692 < X^2_{(crítico)} = 5,99$).

A técnica de PCR detecta a mutação e faz a distinção entre homocigoto e heterocigoto. Esta determinação é de relevante importância, uma vez que apresenta uma relação directa com o fenótipo da doença (2, 6, 11, 30, 41).

Permite também verificar:

- se no decurso da terapia, existe ou não diminuição dos clones mutados, quando é reconhecida a passagem de homocigotia para heterocigotia ou passagem heterocigotia para ausência de mutação.
- Situações clínicas nas quais hajam indícios de evolução da doença, ou mesmo progressão para outro SMP (2, 10, 16, 41) se a passagem do estado de heterocigoto para homocigoto é identificada.

Não se pretende desvalorizar os métodos quantitativos, que permitem um acompanhamento terapêutico mais minucioso. No entanto, como são mais dispendiosos a relação custo benefício parece não justificar a sua implementação. Estudos feitos por Antonioli e colaboradores defendem também que uma vez que nenhuma das terapias existentes conduz a uma cura efectiva da doença, torna-se desnecessário a repetição rotineira do estudo desta mutação (41).

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A descoberta da mutação JAK2 V617F contribuiu para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das SMP Ph-, o que evidencia a importância desta mutação em doentes com diagnóstico ou suspeita de PV, TE e MF. Com o resultado desta análise torna-se mais fácil fazer um diagnóstico preciso e rápido, sendo possível, caso seja diagnosticado uma SMP, serem tomadas medidas terapêuticas mais precoces, prevenindo desta forma a evolução da doença.

Após análise integral dos resultados pode-se concluir que os objectivos propostos foram alcançados. Assim:

- determinou-se a frequência da mutação nos 3 SMP estudados;
- verificou-se que tanto na TE como na MF a frequência obtida se encontra de acordo com o descrito na literatura. No entanto relativamente à PV, a frequência determinada é um pouco mais baixa do que a descrita na literatura, não sendo no entanto esta diferença estatisticamente significativa;
- determinou-se que a mutação JAK2 V617F é estatisticamente significativa nas SMP clássicas Ph-;
- a eficácia da metodologia usada no Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos HUC-EPE na pesquisa da mutação JAK2 V617F foi estatisticamente comprovada.

Futuramente quando se sintetizar um inibidor JAK que possa ser utilizado em doentes com esta mutação poderá ser necessário a implementação de uma técnica quantitativa, não para substituir a utilizada mas como método complementar. Esta terá como finalidade monitorizar mais eficazmente a terapêutica ao verificar a diminuição do número de clones mutados existentes. Será vantajoso implementar um protocolo no qual numa primeira análise seja usada a PCR na detecção da mutação. Posteriormente, durante a fase terapêutica recomenda-se a utilização de uma técnica de PCR em tempo Real quantitativa. Caso se verifique a irradicação da mutação, recomenda-se a utilização do método qualitativo visto ser simples, rápido e economicamente vantajoso.

Embora esta mutação apresente um relevo estatístico tão significativo nestes SMP, não é uma constante, o que leva a supor que será mais uma consequência de um fenómeno, ainda por clarificar. Apesar dos avanços observados nesta área encontram-se em aberto várias linhas de estudo no sentido de clarificar e aprofundar conceitos, que promoverão certamente avanços importantes na área da biologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fox S. Human Physiology. 8th ed: McGraw - Hill; 2004. p. 370-1.
2. Spivac L. Narrative Review: Thrombocytosis, Polycythemia Vera, and JAK2 Mutations: The Phenotypic Mimicry of Chronic Myeloproliferation. *Annals of Internal Medicine*. 2010;152:6.
3. Hoffbrand A, Pettit J. Atlas Colorido de Hematologia Clínica 3ª ed: Manole; 2001. p. 1-12.
4. Hoffbrand A, Pettit E. Essential Hematology. 3 ed: Blakwell Science; 1993. p. 1-11.
5. Kralovics R, Passimonti F, Buser A, Teo S, Tiedt R, Passweg J, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New England Journal of Medicine*. 2005;352:12.
6. Jones A, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders. *Blood*. 2005;106:7.
7. Levine R, Loriaux M, Huntly B, Loh M, Beran M, Stoffregen E. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106:3.
8. Marubayashi S, Koppikar P, Taldone T, Abdel-Wahab O, West N, Neha B, et al. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative disorders neoplasms in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120:15.
9. Monte-Mór B, Costa F. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2008;30:8.

10. Levine R, Gilliland G. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;112:8.
11. Percy M, McMullin M. The V617F mutation and the myeloproliferative disorders. *Hematological Oncology*. 2005;23:3.
12. Brière J. Essential thrombocythemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2007;2:17.
13. Leibundgut E, Horn M, Brunold C, Pfanner-Meyer B, Marti D, Hirsiger H, et al. Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases. *Haematologica*. 2006;91:8.
14. Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Massé A, Godin I, Couedic J, et al. Evidence that the JAK2 G1849 (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007;109:8.
15. Moliterno R, Williams M, Rogers O, Isaacs A, Spivak L. Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: The roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Experimental Hematology*. 2008;36:7.
16. Villeval J, James C, Pisani D, Casadevall N, Vainchenker W. New Insights into the Pathogenesis of JAK2 V617F-Positive Myeloproliferative Disorders and Consequences for the Management of Patients. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2006;32:11.
17. Girodon F, Bonicelli G, Schaeffer C, Mounier M, Carillo S, Lafon I, et al. Significant increase in apparent incidence of essential thrombocythemia related to new WHO diagnostic criteria: a population-based study. *Haematologica*. 2009;96:5.
18. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz S, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in Polycythemia Vera. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:5.
19. Barbui T, Barosi G, Grossi A, Gugliotta L, Liberato L, Marchetti M, et al. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian

Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for the Bone Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2004;89:17.

20. Harrison C. Essential Thrombocythemia: challenges and evidence-based management. *British Journal of Haematology*. 2005;130:12.

21. Harrison C. Pregnancy and its management in the Philadelphia negative myeloproliferative diseases. *British Journal of Haematology*. 2005;129:13.

22. Goh H, Lee S, Cho D, Park S, Hwang J, Sung J. Chronic Idiopathic Myelofibrosis presenting as cauda equina compression due to extramedullary hematopoiesis: a case report. *The Korean Academy of Medical Sciences*. 2007;22:4.

23. Horwood E, Dawson H, Gupta R, Kaczmarski R, Williamson W. Myelofibrosis presenting as spinal cord compression. *Journal of Clinical Pathology*. 2003;56:3.

24. Yi C, Cardama A, Giles F, Thomas D, Yalan A, Cortes J, et al. Advances in the Therapy of Chronic Idiopathic Myelofibrosis. *The Oncologist*. 2006;11:15.

25. Vener C, Fracchiolla N, Gianelli U, Calori R, Radaelli F, Lurlo A, et al. Prognostic implication of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in Chronic Idiopathic Myelofibrosis. *Blood*. 2008;111:4.

26. References GH. JAK2. Pubmed 2010; Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/JAK2>.

27. Baxter E, Scott L, Campbell P, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:8.

28. Paradis F, Simard R, Gaudet D. Quantitative assay for the detection of the V617F variant in the Janus Kinase (JAK2) gene using the Luminex xMAP technology. *BMC Medical Genetics*. 2010;11:9.

29. Rawlings S, Rosler K, Harrison D. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2004;117:4.
30. Won H, Park I, Lee E, Kim J, Lee D. Comparative analysis of the JAK/STAT signaling through erythropoietin receptor and thrombopoietin receptor using a systems approach *BMC Bioinformatics*. 2009;10:10.
31. Ke Shuai BL. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system *Nature Reviews Immunology*. 2003;3:11.
32. Ward C, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000;91:10.
33. Levine R, Werning G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *American Society of Hematology*. 2006:7.
34. Schindler C. JAK-STAT signaling in human disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;109:5.
35. Sayyah J, Sayeski P. Jak Inhibitors: rationale and role as therapeutic agents in Hematologic Malignancies. *Current Oncology Reports*. 2009;11:8.
36. Lacout C, Pisani F, Tulliez M, Gachelin F, Vainchenker W, Villeval J. JAK2 V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108:9.
37. Werning G, Mercher T, Okabe R, Luevine L, Lee H, Gilliland G. Expression of JAK2 V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2006;107:8.
38. Bennett M, Stroncek D. The domains of JAK2 illustrating binding to the receptor and changes consequent to receptor binding and mutation in the JH2 domain. *Journal of Translational Medicine*. 2006;4:9.

39. Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108:7.
40. Sattler M, Walz C, Crowley B, Lenfelder E, Janne A, Kuang Y, et al. A sensitive high-throughput method to detect activating mutations of JAK2 in peripheral-blood samples. *Blood*. 2006;107:2.
41. Antonioli E, Carobbio A, Pieri L, Pancrazzi A, Guglielmelli P, Delaini F, et al. Hydroxiurea does not appreciable reduce JAK2 V617F allele burden in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2010;95:4.