**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

MARIANA MARCHIANI

**Estudo do perfil genético de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas
(NMP) cromossomo Filadélfia negativo**

São Paulo
2015

MARIANA MARCHIANI

**Estudo do perfil genético de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas
(NMP) cromossomo Filadélfia negativo**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Israel Bendit

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Marchiani, Mariana

Estudo do perfil genético de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) cromossomo Filadélfia negativo / Mariana Marchiani. -- São Paulo, 2015.

Dissertação (mestrado) --Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Israel Bendit.

Descritores: 1.Policitemia vera 2.Mielofibrose primária 3.Trombocitemia essencial 4.Janus quinase 2 5.Calreticulina 6.Transtornos mieloprofilerativos

USP/FM/DBD-476/15

Nome: Mariana Marchiani

Título: Estudo do perfil genético de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) cromossomo Filadélfia negativo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcio e Neide e minha irmã, Marilia pela paciência, apoio e fé no sucesso desse trabalho.

Ao meu marido, Luiz Gustavo, por não me deixar desistir dos meus sonhos e aceitar todas as ausências por conta deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me proporcionou força e coragem para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Israel Bendit, meu orientador, pela oportunidade, conhecimento, paciência e orientação.

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Tumoral e Citogenética, por todo o apoio e dedicação, em especial ao Ismael e Toninho pela paciência em me ouvir e me ajudar nos momentos difíceis e a Luciana, minha chefe, por permitir a realização deste trabalho, seja por meio da liberação de amostras, seja pelo apoio e permissão para o estudo durante uma grande rotina de trabalho.

À minha família, principalmente meus pais, irmã e ao meu marido, que sempre me incentivaram a crescer profissionalmente e que sempre estiveram ao meu lado para o que fosse necessário para que esse trabalho fosse realizado e aceitaram todas as minhas ausências para estudos, mesmo durante os finais de semana.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doenças mieloproliferativas	1
1.1.1. Policitemia vera	2
1.1.2. Trombocitemia essencial	5
1.1.3. Mielofibrose primária	6
1.2. Alterações genéticas nas NMP	9
1.2.1. Via JAK-STAT	9
1.2.2. <i>JAK2</i>	12
1.2.3. Mutação <i>JAK2V617F</i>	14
1.2.4. Mutações <i>JAK2</i> exon 12	16
1.2.5. Mutações resistentes de <i>JAK2</i>	16
1.3. Outras mutações mutuamente independentes – <i>MPL</i> e <i>CALR</i>	17
1.3.1. Mutações em <i>MPL</i>	17
1.3.2. Calreticulina (<i>CALR</i>) e mutações	20
1.4. Alterações epigenéticas	24
1.4.1. <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	25
1.4.2. <i>TET2</i>	27
1.4.3. <i>ASXL1</i>	29
2. OBJETIVOS	30
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1. Extração de DNA e RNA e Síntese de cDNA	31
3.2. Detecção de <i>JAK2V617F</i> por PCR-RFLP	32
3.3. Sequenciamento direto – Técnica de Sanger	32
3.4. Análise de fragmentos	34
3.5. Análise estatística	34

4. RESULTADOS.....	36
4.1. Frequência das mutações encontradas.....	37
4.1.1. <i>JAK2V617F</i>	38
4.1.2. <i>JAK2</i> exon 12	39
4.1.3. <i>JAK2Y931C</i>	40
4.1.4. <i>MPL</i>	41
4.1.5. <i>CALR</i>	42
4.1.6. <i>IDH1/IDH2</i>	43
4.1.7. <i>ASXL1</i>	45
4.1.8. <i>TET2</i>	46
4.2. Coocorrência de mutações	48
4.2.1. <i>JAK2V617F</i>	50
4.2.2. <i>JAK2Y931C</i>	50
4.2.3. <i>CALR</i>	51
4.2.4. <i>IDH1</i>	51
4.2.5. <i>IDH2</i>	51
4.2.6. <i>ASXL1</i>	52
4.2.7. <i>TET2</i>	52
4.3. Correlação entre as características clínicas e as mutações encontradas.	53
4.3.1. PV	53
4.3.2. TE	54
4.3.3. MFP.....	55
4.3.4. Leucemias/SMD e Suspeitas de NMP	56
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
°C	Graus Celsius
2-HG	2-Hidroxiglutarato
<i>ASXL1</i>	“Additional Sex comb like 1”
Bcl-2	Célula B de linfoma 2 – proteína anti-apoptótica
<i>BCR-ABL</i>	Oncoproteína formada pela translocação de “Abelson” protooncogene localizado no cromossomo 9 com a região BCR (“breakpoint cluster region”) do cromossomo 22
BSA-XI	<i>Bacillus Stearothermophilus</i> – enzima de clivagem de DNA
Ca ²⁺	Cálcio
CALNUC	Transportador de cálcio encontrado no complexo de Golgi e citoplasma
<i>CALR</i>	Gene que codifica a proteína calreticulina
CAMT	Tombocitemia amegacariocítica congênita
CAPPesp	Comitê de Ética para análise de projetos de pesquisa
CBL	Gene que codifica proteína responsável por levar substratos para degradação no proteassoma
CD110	Proteína codificada pelo gene <i>MPL</i>
cDNA	DNA complementar
DIPSS	“Dynamic International Prognostic Scoring System”
DMP	Doença mieloproliferativa
DNA	“ Deoxyribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos trifosfatados
DUB	Enzima Deubiquitinase
EPO	Eritropoetina

EZH2	Gene que codifica um membro da família polycomb responsável pela manutenção do estado repressivo de transcrição de genes
FAM	Fosforamidita
Fe	Ferro
FERM	Região N-terminal de JAK que contém domínios de erzina, radixina e moesina
g/dL	Gramas por decilitro
5-HMC	Citocinas 5-hidroximetiladas
HARE-HTH	Domínio N-terminal de <i>ASXL1</i>
HiDi	“highly deionized” – altamente deionizado
<i>IDH1</i>	“Isocitrate dehydrogenase 1”
<i>IDH2</i>	“Isocitrate dehydrogenase 2”
IKZF1	Gene que codifica fator de transcrição associado com remodelação da cromatina
IL	Interleucina
ING-MRT	“International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment”
IPSS	“International Prognostic Scoring System”
<i>JAK1</i>	Janus Kinase 1
<i>JAK2</i>	Janus Kinase 2
<i>JAK3</i>	Janus Kinase 3
JH1-7	Domínios homólogos de JAK
KDEL	“Endoplasmatic Reticulum Retention Motif”
L	Litro
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMA M7	Leucemia Megacarioblástica Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LNK	Gene que codifica proteína reguladora negativa de sinalização da via JAK-STAT
MFP	Mielofibrose Primária

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	Milimolar
mm ³	Milímetros cúbicos
<i>MPL</i>	“Myeloproliferative Leukemia vírus oncogene” – Receptor de trombopoetina
Multi-CSF	“Colony stimulating factor” – fator de estimulação de crescimento de colônias
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – coenzima
NADPH	Forma reduzida de NADP
NMP	Neoplasias mieloproliferativas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR2	“Polycomb repressive complex 2” – participa da compactação da cromatina e metilação da histona 3
PCR-RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism” – Sistema de amplificação refratária de mutação
Ph	Cromossomo Philadelphia
PHD	Homodomínio C-terminal de <i>ASXL1</i>
PIAS	Proteínas inibidoras de STATs ativadas
Pi3K/AKT/mTOR	Cascata de sinalização intracelular
Pmoles	Picomoles
PV	Policitemia Vera
RARS-t	“Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis” -Anemia Refratária com sideroblastos associada à marcada Trombocitose
RAS-MAPK	Cascata de sinalização intracelular
RNA	Ácido Ribonucleico
ROX	Padrão de peso molecular
SAP	Domínio N-terminal de PIAS
Scr	“Sex comb reduced” – relacionado ao complexo regulatório
SERCA2b	“Sarco/endoplasmatic reticulum Ca ²⁺ ATPase” – transfere cálcio do citosol para retículo sarcoplasmático

SH2-3	Domínios homólogos de ligação ao Scr de JAK
SHP-1	Proteína citoplasmática com ação de tirosina fosfatase
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SOCS	Supressores de sinalização de citocinas
STAT	“Signal Transduction And Transcription” - Transdutor de sinal e ativador transcricional
SUZ12	Proteína da família polycomb
TE	Trombocitemia Essencial
<i>TET2</i>	“Tet methylcytosine dioxygenase 2” – codifica enzima que realiza hidroximetilação de citocinas
TPO	Trombopoetina
TYK2	“Tyrosine Kinase 2” – membro da família JAK
µg	Micrograma
µL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: IPSS e DIPSS para Mielofibrose primária. ¹⁵	9
Figura 2: Representação da estrutura de <i>JAK</i> . ¹⁸	10
Figura 3: Identificação de todas as mutações encontradas nos exons 12 ao 15 na estrutura de <i>JAK2</i> . ¹⁹	13
Figura 4: Sinalização de <i>JAK2V617F</i> . ¹⁸	15
Figura 5: Resumo esquemático dos mecanismos das diferentes mutações no gene <i>c-MPL</i> humano com efeitos biológicos distintos. ³¹	19
Figura 6: Efeito dos domínios da Calreticulina. ³⁴	21
Figura 7: Alteração de frameshift com novo C-terminal associado com mutações em <i>CALR</i> . ⁴⁰	23
Figura 8: Funções normais de IDH para conversão de isocitrato em α -cetoglutarato. ⁴⁶	26
Figura 9: Esquema das mutações somáticas de <i>TET2</i> em neoplasias hematopoiéticas. ⁵⁴	28
Figura 10: Visualização da eletroforese dos produtos de PCR-RFLP para mutação <i>JAK2V617F</i> . A: PCR com a presença de fragmento de 360pb para todas as amostras. B: Visualização dos mesmos produtos após a digestão com a enzima BSAXI. 2P: duas populações; SEL: selvagem e MUT: com a mutação V617F em <i>JAK2</i> .	39
Figura 11: Sequenciamento mostrando a mutação K539L de <i>JAK2</i> .	40
Figura 12: Sequenciamento mostrando a mutação Y931C de <i>JAK2</i> .	41
Figura 13: Eletroferograma da análise de fragmentos do gene <i>CALR</i> . A: mutação do tipo 1(deleção de 52pb); B: mutação do tipo 2 (inserção de 5pb).	42
Figura 14: Sequenciamento mostrando mutações encontradas em <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> . A: Mutação V71I de <i>IDH1</i> ; B: mutação R132H de <i>IDH1</i> ; C: Mutação R140Q de <i>IDH2</i> .	44
Figura 15: Sequenciamento mostrando algumas das mutações encontradas no gene <i>ASXL1</i> . A: mutação R647Q; B: mutação I633V.	45
Figura 16 Sequenciamento mostrando algumas das mutações encontradas no gene <i>TET2</i> . A: mutação P29R no exon 3 de <i>TET2</i> ; B: mutação L34F no exon 3	

de *TET2*; C: mutação H1778R no exon 11 de *TET2*; D: mutação I1762V no exon 11 de *TET2*. 47

Figura 17: Correlações entre as mutações *JAK2V617* e *TET2* com as características hematológicas dos pacientes com PV. 54

Figura 18: Correlações entre as mutações *JAK2V617* e *ASXL1* com as características hematológicas dos pacientes com MFP. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios diagnósticos para Policitemia Vera segundo a Organização Mundial de Saúde 2008.	3
Tabela 2: Resultados histológicos sistemáticos de medula óssea que auxiliam na discriminação de neoplasias mieloproliferativas. ⁶	4
Tabela 3: Critérios diagnósticos para Trombocitemia Essencial segundo a Organização Mundial de Saúde 2008. ³	5
Tabela 4: Estratificação de risco de TE. ⁶	6
Tabela 5: Critério diagnóstico para mielofibrose primária segundo a OMS 2008. ³	8
Tabela 6: Classificação e características clínicas das mutações em <i>MPL</i> identificadas em doenças hematopoiéticas. ³¹	18
Tabela 7: Sequências dos primers para PCR e sequenciamento.....	33
Tabela 8: Características hematológicas dos pacientes estudados.....	36
Tabela 9: Resumo das frequências das mutações.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Coocorrência de mutações em pacientes com NMP.....	49
---	----

RESUMO

Marchiani M. Estudo do perfil genético com Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) cromossomo Filadélfia negativo [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) Filadélfia negativo como a policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP) são desordens clonais da célula tronco hematopoiética caracterizadas pela produção excessiva de células mielóides diferenciadas. Este fenômeno ocorre devido à uma mutação somática (*JAK2V617F*) que ativa a via JAK-STAT de transdução de forma constitutiva. Esta mutação é mais frequente na PV, ocorrendo em 95% dos casos, e em 50% dos casos de TE e MFP. Outro defeito genético que ocorre é a mutação no receptor de trombopoetina, *MPL*. As mutações em *MPL* podem ser germinativas ou somáticas e menos de 10% dos pacientes com TE e MFP apresentam essa alteração genética. Entretanto, grande parte dos pacientes com TE e MFP que não apresentam mutação em *JAK2V617F* ou *MPL* podem apresentar mutações somáticas no gene *CALR*. Em adição às mutações somáticas que causam mieloproliferação, outras alterações genéticas em genes que funcionam como reguladores epigenéticos são encontrados nas NMPs nos genes *TET2*, *IDH1*, *IDH2* e *ASXL1*. **Objetivo:** Estabelecer um perfil genético em pacientes com NMP através da avaliação de mutações nos genes *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2* e *ASXL1* assim como estabelecer uma correlação laboratorial destas na PV, TE e MFP. **Casuística e Métodos:** Foram utilizadas amostras de sangue periférico de 104 pacientes que foram enviadas para o Laboratório de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para avaliação diagnóstica. Quinze dos 104 pacientes são de pacientes com PV (14,4%), 20/104 (19,2%) com MFP, 20/104 (19,2%) com TE e 49/104 (47,1%) com outras doenças hemtológicas. Foi feita a avaliação da prevalência de mutações somáticas, seja por sequenciamento ou análise de fragmentos, nos genes *JAK2* (exon 12 e Y931C), *MPL*, *IDH1*, *IDH2*,

CALR, *TET2* e *ASXL1*. PCR-RFLP foi realizada para identificação de mutações em *JAK2V617F*. **Resultados:** A mutação *JAK2V617F* foi observada em 30 (28,8%) pacientes (12 PV, 11 TE e 7 MFP), a mutação *JAK2* exon 12 foi observada em apenas um (0,96%) paciente com PV, mutação *JAK2Y931C* em 4 (3,8%) pacientes (1 PV, 2 TE e 1 MFP) e 8 (7,7%) pacientes apresentaram mutações em *CALR* (3 TE e 5 MFP). Mutações nos genes epigenéticos como *IDH1* foram observadas em 9 (8,7%) pacientes (2 TE, 2 MFP, 1 SMD, e 4 pacientes com suspeita de NMP), mutações em *IDH2* estão presentes em 5 (4,8%) pacientes (2 TE, 1 SMD/leucemia e 4 pacientes com suspeita de NMP), mutações em *ASXL1* foram identificadas em 13 (12,5%) pacientes (1 PV, 3 TE, 2 MFP, 3 SMD/leucemias e 4 com suspeita de NMP) e finalmente, mutações em *TET2* foram encontradas em 33 (31,7%) pacientes (3 PV, 5 TE, 4 MFP, 8 SMD/leucemias e 13 pacientes com suspeita de NMP). Além disso, no caso da PV, os pacientes que apresentam mutações em *JAK2V617F* apresentam valores aumentados de plaquetas (mediana de $5,41 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas) em relação aos pacientes sem a mutação (mediana de $2,06 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas), com diferença estatística ($p=0,031$). Pacientes do mesmo grupo que apresentam mutações em *TET2* apresentam, opostamente aos com mutações em *JAK2V617F*, menores valores de plaquetas (mediana de $1,75 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas) em relação aos pacientes sem mutações no gene *TET2* (mediana de $5,41 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas), com diferença estatística ($p=0,048$). No caso da MFP, os pacientes que apresentam mutações em *JAK2V617F* apresentam valores maiores de leucócitos (mediana de $1,09 \times 10^4/\text{mm}^3$ leucócitos) do que os pacientes que não apresentam a mutação (mediana de $6,99 \times 10^3/\text{mm}^3$ leucócitos) com diferença estatística ($p=0,046$), já os pacientes que apresentam mutações no gene *ASXL1* apresentam valores menores de hemácias (mediana de $2,43 \times 10^6/\text{mm}^3$ hemácias) em relação aos pacientes que não apresentam mutação (mediana de $3,71 \times 10^6/\text{mm}^3$ hemácias) com diferença estatística ($p=0,042$). **Conclusão:** O trabalho permitiu fornecer um perfil genético dos pacientes com NMP estudados. Além disso, é possível observar que algumas mutações epigenéticas podem influenciar em diferenças clínicas.

Descritores: Policitemia vera; mielofibrose primária; trombocitemia essencial; Janus quinase 2; Calreticulina; transtornos mieloproliferativos.

ABSTRACT

Marchiani M. *Study of genetic profile of patients with Philadelphia-negative Myeloproliferative Neoplasms (MPN)* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) Philadelphia (Ph) chromosome negative, such as polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are clonal disorders of hematopoietic stem cell characterized by increased proliferation of differentiated myeloid cells. This phenomenon occurs due somatic mutation (*JAK2V617F*) that constitutively stimulates the JAK-STAT signaling pathway. This mutation is more frequent in PV, around 95%, and between 50% in ET and PMF. Other genetic aberration can be observed in the thrombopoietin (TPO) receptor *MPL*. Mutations in *MPL* can be in the germline line or somatic and less than 10% of patients with TE or PMF would harbor this genetic alteration. Otherwise, patients with TE or PMF without *JAK2V617F* or *MPL* mutation could present somatic mutations in calreticulin (*CALR*). In addition to somatic mutations that cause myeloproliferation, other genetic alterations that function as epigenetic regulators were identified in genes as *TET2*, *IDH1*, *IDH2* e *ASXL1* in MPN. **Objective:** Establish genetic profile in patients with diagnosis of PV, ET, and PMF through genetic alterations in the following genes: *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2* e *ASXL1*, and correlate those alterations with demographic characteristic of the study population. **Casuistic and Methods:** Peripheral blood samples from 104 patients referred to the Tumor Biology Laboratory of the Department of Hematology of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo for diagnostic investigation were analyzed. Fifteen out 104 samples were from PV patients (14.4%), 20/104 (19.2%) in PMF, 20/104 (19.2%) in ET and 49/104 (47.1%) with other hematologic diseases. Identification of somatic mutations was made, either by direct sequencing or fragment analysis in *JAK2* (exon 12 and Y931C), *MPL*, *IDH1*, *IDH2*, *CALR*, *TET2* and *ASXL1*. PCR-RFLP was performed to identify *JAK2V617F* mutation. **Results:** *JAK2V617F* mutation was observed in 30 (28.8%) patients (12 PV, 11 ET and 7 PMF), *JAK2* exon 12 in only one (0.96%)

patient with PV, *JAK2*Y931C in 4 (3.8%) patients (1 PV, 2 ET and 1 PMF), and 8 patients (7.7%) presented *CALR* mutation (3 ET and 5 PMF). Mutations in the epigenetic genes as *IDH1* were observed in 9 (8.7%) patients (2 ET, 2 PMF, 1 MDS and 4 patients with suspected MPN), *IDH2* mutations were present in 5 (4.8%) patients (2 ET, 1 MDS/leukemia, and 4 patients with suspected MPN), *ASXL1* mutations were identified in 13 (12.5%) patients (1 PV, 3 ET, 2 PMF, 3 MDS/leukemia and 4 with suspected MPN) and finally, *TET2* mutations were present in 33 (31.7%) patients (3 PV, 5 ET, 4 PMF, 8 MDS/leukemia, and 13 with suspected MPN). In addition, patients with PV who harbor *JAK2*V617F have increased platelet counts (median $5.41 \times 10^5/\text{mm}^3$ platelets) compared to those without the mutation (median $2.06 \times 10^5/\text{mm}^3$ platelets, $p=0.031$). Patients in the same group with *TET2* mutation, as opposed to those with *JAK2*V617F, presented low platelets counts (median of $1.75 \times 10^5/\text{mm}^3$ platelets) compared to those without *TET2* mutation (median $5.41 \times 10^5/\text{mm}^3$ platelets, $p=0.048$). Presence of *JAK2*V617F in patients diagnosed with PMF have a greater number of leukocytes (median $1.09 \times 10^4/\text{mm}^3$ leukocytes) when compared to patients without the mutation (median $6.99 \times 10^3/\text{mm}^3$ leukocytes, $p=0.046$). Patients with PMF who presented mutations in *ASXL1* gene have a lower number of red blood cells (median of $2.43 \times 10^6/\text{mm}^3$) compared to patients without mutations in the same gene (median $3.71 \times 10^6/\text{mm}^3$, $p=0.042$). **Conclusion:** The present study allows us to provide a genetic profile of patients with MPN. Furthermore, it is possible to observe that some epigenetic mutations could influence in some clinical differences.

Descriptors: polycythemia vera; primary myelofibrosis; thrombocythemia, essential; Janus kinase 2; Calreticulin; myeloproliferative disorders.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças mieloproliferativas

As doenças mieloproliferativas (DMP) foram inicialmente propostas por Dameshek em 1951 e são desordens clonais de células-tronco hematopoiéticas caracterizadas pela proliferação de uma ou mais linhagens celulares mielóides na medula óssea e aumento na concentração de células maduras no sangue periférico, o que leva à leucocitose, aumento da massa eritrocitária ou trombocitose.^{1, 2}

A Organização Mundial de Saúde, OMS, inicialmente em 2001 e depois em 2008 reclassificou essas doenças envolvendo aspectos histológicos, citogenéticos e moleculares e determinou que fossem denominadas neoplasias mieloproliferativas (NMP), onde se incluem: policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP) e leucemia mielóide crônica (LMC), além de uma série de subtipos como a leucemia neutrofílica crônica, síndrome hipereosinofílica e leucemia eosinofílica crônica.^{3, 4}

Apesar de todas elas compartilharem uma série de fatores como: a origem em uma célula progenitora hematopoiética multipotente, dominância clonal de células progenitoras malignas em relação às células normais, produção aumentada de um ou mais elementos do sangue, hematopoiese extramedular e transformação em leucemia aguda nas mais variadas proporções, a distinção entre as doenças mieloproliferativas crônicas e em relação a outras condições semelhantes pode ser muito difícil. O problema é que as apresentações clínicas destas doenças são variáveis, e das quatro citadas, apenas a leucemia mielóide crônica apresenta um marcador diagnóstico específico, o cromossomo Filadélfia (Ph), que é a translocação entre os cromossomos 9 e 22, resultando na formação da proteína quimérica *BCR-ABL* com atividade de tirosina-quinase.⁵

1.1.1. Policitemia vera

A policitemia vera é uma doença mieloproliferativa caracterizada pelo aumento na quantidade de eritrócitos como resultado de uma proliferação autônoma e clonal de “stem cells” da medula óssea, estando também associada com a produção descontrolada de leucócitos e plaquetas.⁶

Os sinais e sintomas da PV são causados pelo aumento dos eritrócitos, o que acarreta em aumento da viscosidade e redução do fluxo sanguíneo. Os sintomas são observados em pacientes de meia idade, que apresentam caracteristicamente, coloração cianótica, predominantemente na face, mas também nos lábios, nariz e orelhas. A mesma coloração é vista também nos membros distais.⁶

As maiores queixas estão relacionadas com enxaquecas, zumbido, parestesia e eritromelalgia ligadas a vaso-oclusão. Prurido pode acontecer após banhos quentes ou mornos e podem ser uma exacerbação da gota. Todos esses sintomas tendem a desaparecer com o tratamento. A maior parte dos pacientes apresenta ainda esplenomegalia em variados graus ao diagnóstico ou durante a evolução da doença. Mielofibrose secundária à PV e leucemia aguda ou síndrome mielodisplásica podem desenvolver-se numa minoria dos pacientes, geralmente numa fase tardia da doença.^{7, 8}

A PV é mais comum em mulheres, onde acontece de forma mais precoce e está associada com maiores frequências de esplenomegalia, eritrocitose primária, e trombose de veia hepática.⁸

Segundo a OMS, o diagnóstico requer que o paciente apresente os dois critérios maiores ou o primeiro critério maior e dois critérios menores, como se segue na tabela 1:

Tabela 1: Critérios diagnósticos para Policitemia Vera segundo a Organização Mundial de Saúde 2008. ³

Critérios Maiores	1)	Hemoglobina > 18,5 g/dL (homens) ou > 16, 5g/dL (mulheres); ou
		Hemoglobina e/ou hematócrito > percentil 99 dos valores de referência para idade, sexo ou altitude de residência; ou
		Hemoglobina > 17g/dL (homens) ou > 15g/dL (mulheres) se associado com um aumento sustentado de mais de 2g/dL nos níveis de base do paciente e que não podem ser atribuídos a correção de anemia ferropriva; ou
		Elevação na massa eritrocitária > 25% acima do valor normal previsto;
	2)	Presença de mutação <i>JAK2V617F</i> ou no exon 12 de <i>JAK2</i>
Critérios Menores		Medula óssea com proliferação (hiperplasia) de todas as linhagens;
		Níveis de eritropoietina sérica abaixo do normal;
		Crescimento autônomo de colônias eritróides em cultura;

É necessária a presença de dois critérios maiores e um critério menor ou a presença do primeiro critério maior e de dois critérios menores.

A mutação de *JAK2V617F* é encontrada em mais de 95% dos casos de PV e os níveis séricos de eritropoietina (EPO) são subnormais em 90% dos pacientes. Mutações em *JAK2* exon 12 estão presentes na maior parte dos pacientes negativos para *JAK2V617F* e em aproximadamente 3% de todos os pacientes com PV.⁴

Em relação aos achados histológicos, a biópsia de medula óssea mostra mieloproliferação das três linhagens celulares e/ou a presença de colônias eritróides endógenas no esfregaço de sangue periférico. A proliferação de megacariócitos pleomórficos, não agrupados com modificações únicas no estroma e sem defeitos de maturação são comumente encontrados em pacientes com PV, mas não são critérios diagnósticos. A tabela 2 abaixo resume as características histológicas da PV.⁶

Tabela 2: Resultados histológicos sistemáticos de medula óssea que auxiliam na discriminação de neoplasias mieloproliferativas.⁶

Achados histológicos			Policitemia Vera	Trombocitemia essencial	Mielofibrose primária	
					Fase celular	Fase fibrótica
Aumento Celularidade				++	+++++	++
Granulopoiese	Aumentada		+++++	++++	0	
	Desvio a esquerda	++++	+++++	+++	++	
Eritropoiese	Aumentada	+++++	+	+	0	
	Desvio a esquerda	+++++	+	++	+	
Megacariopoiese	Aumentada	++++	+++++	++++	+++	
	Tamanho	Pequeno	+++	0	+++	+++
		Médio	+++	++	++	++
		Grande	+++	+++	+++	++
		Gigante	++	+++	++	+
	Topografia	Translocação endosteal	++	++	+++	+++
	Tamanho cluster	Pequeno (>3)	++	++	++++	++++
		Grande (>7)	+	0	+++	+++
	Tipo cluster	Denso	+	0	+++	++++
		Frouxo	+++	+++	++++	++
	Formato núcleo	Hipolobulação	++	+	++++	++++
		Hiperlobulação	++++	++++	++++	+++++
	Defeitos de Maturação		0	0	++++	+++++
	Núcleo Vazio		+++	+++	++++	+++++
Fibras		Aumento reticulínicas	++	0	++++	+++++
		Aumento colágenas	0	0	0	+++++
Osteosclerose			0	0	0	+++
Depósito de ferro			0	+++	++	+
Presença de nódulos linfoides			++	0	++	+
Semi-quantificação: 0 usualmente ausente; + rara; ++ leve; +++ moderado; ++++ manifestado; +++++ evidente						

Quanto a estratificação de risco, esta é baseada na probabilidade de eventos trombóticos. Vários estudos identificaram a idade acima de 60 anos e trombose precoce como os principais fatores de alto risco. Risco cardiovascular e leucocitose também devem ser considerados e são considerados de risco intermediário. A ausência destes fatores determina pacientes de baixo risco.⁸

1.1.2. Trombocitemia essencial

A trombocitemia essencial é uma desordem clonal caracterizada por proliferação de megacariócitos com consequente aumento de plaquetas no sangue periférico. Pode progredir para mielofibrose ou leucemia mielóide aguda. É rara em crianças, sendo predominante em adultos de meia idade e em mulheres.^{9,10}

Como sintomas vasomotores, tem-se enxaqueca, tonturas, zumbido, síncope, formigamento, alteração visual, além de eritromialgia, traduzida como queimação nos pés ou mãos com vermelhidão. Aproximadamente 25 a 35% dos pacientes são assintomáticos e esplenomegalia leve é observada em 40% dos pacientes. Sangramentos e eventos trombóticos, causados por embolismo pulmonar ou síndrome de Budd-Chiari, são responsáveis pela mortalidade e morbidade destes pacientes.⁶

Segundo a Organização Mundial de Saúde 2008, para o diagnóstico de TE, o paciente deve apresentar todos os critérios maiores, listados abaixo:

Tabela 3: Critérios diagnósticos para Trombocitemia Essencial segundo a Organização Mundial de Saúde 2008.³

Critérios maiores
Contagem de plaquetas > ou igual a $450 \times 10^9/L$;
Aumento de megacariócitos e ausência de precursores eritróides e elementos da série granulocítica na medula óssea;
Presença da mutação <i>JAK2V617F</i> ou mutações em <i>MPL</i> ;
Ausência de critérios para outras Neoplasias Mieloproliferativas.

Deve-se considerar como fator diagnóstico também a presença de mutações no receptor de trombopoetina (*MPL*), já que os precursores de

megacariócitos são hipersensíveis à trombopoetina (TPO). Neste caso, aproximadamente 35% dos pacientes com TE apresentam positividade para *JAK2V617F* e aproximadamente 5 a 10% apresentam mutações em *MPL*.¹¹

Em relação às características histológicas, tem-se aumento da linhagem megacariocítica, com alta quantidade de megacariócitos hiperlobulados e maduros. Não há aumento significativo de eritropoiese ou da linhagem granulocítica-neutrófila e não há aumento das fibras reticulínicas. A tabela 2 resume esses achados histológicos.⁴

A estratificação de risco também é baseada na presença de eventos trombóticos, onde os pacientes podem ser classificados em:

Tabela 4: Estratificação de risco de TE.⁶

Alto risco	Risco Intermediário	Baixo risco
Idade > 60 anos	Idade >40 e <60 anos	Idade <40 anos
Episódios de sangramento ou eventos trombóticos	Presença de riscos cardiovasculares (fumo, dislipidemia, hipertensão)	Sem eventos trombóticos e fatores de risco
Contagem de plaquetas >1500 10 ⁹ /L	Contagem de plaquetas < 1500 10 ⁹ /L	Contagem de plaquetas < 1500 10 ⁹ /L

1.1.3. Mielofibrose primária

A mielofibrose primária é um distúrbio clonal de uma célula progenitora hematopoiética multipotente, caracterizada por fibrose da medula óssea, hematopoiese extramedular e esplenomegalia. É a forma mais grave das neoplasias mieloproliferativas.¹²

A mielofibrose primária tem uma apresentação clínica heterogênea. Aproximadamente 30% dos pacientes são assintomáticos ou podem apresentar esplenomegalia no exame clínico ou em análises de sangue de rotina,

apresentar anemia, leucocitose e/ou trombocitose. Os pacientes podem apresentar ainda sintomas constitucionais como dispnéia, fadiga, sudorese noturna, perda de peso, febre e sangramento. Alguns pacientes apresentam ainda cálculos renais e gota devido a hiperuricemia. A esplenomegalia está presente em 90% dos casos.¹²

A MFP ocorre mais comumente em pacientes com 60 a 70 anos. Exposição a benzeno ou radiação ionizante está presente em alguns casos e existem apenas raros casos familiares, além de ocorrer igualmente entre homens e mulheres.¹²

A maior parte dos pacientes com MFP (50-60%) apresenta positividade para *JAK2V617F*, e uma minoria apresenta mutações em *MPL*, *LNK*, *CBL*, *TET2*, *ASLX1*, *IDH1*, *IKZF1* ou *EZH2*. Apesar da mieloproliferação clonal, um estado inflamatório secundário acontece, caracterizado por alterações no estroma medular e expressão anormal de citocinas.¹³

O diagnóstico da MFP pode ser dado pela biópsia de medula óssea, onde há proliferação de megacariócitos hipercrômicos com grande núcleo irregular, em associação com fibrose reticulínica ou colágena e na ausência de fibrose reticulínica significativa, as modificações nos megacariócitos devem estar acompanhadas por uma aumento na celularidade medular caracterizada por proliferação granulocítica e geralmente redução da eritropoiese (Fase celular pré-fibrótica). Na fase fibrótica há um aumento das fibras reticulínicas, mas não há presença de colágeno. Há pleomorfismo de megacariócitos, além de grande alteração do raio entre citoplasma e núcleo, núcleo hiperlobulado e hipercromático e perda da maturação celular. O resumo das características histológicas da MFP está apresentado na tabela 2.⁶

Sendo assim, segundo a Organização Mundial de Saúde, os pacientes precisam apresentar os três critérios maiores e dois critérios menores, mostrados na tabela 5 para serem diagnosticados com MFP.³

Tabela 5: Critério diagnóstico para mielofibrose primária segundo a OMS 2008.³

Critérios Maiores	Critérios Menores
1) Proliferação megacariocítica e atipia acompanhada de fibrose reticulínica e/ou colágena <p style="text-align: center;">ou</p> Na ausência de fibrose reticulínica, as mudanças em megacariócitos devem estar acompanhadas por aumento da celularidade medular, proliferação granulocítica e frequentemente redução da eritropoiese (MFP pré-fibrótica) 2) Não apresentar nenhum critério para outra neoplasia mieloproliferativa 3) Detecção da Mutação <i>JAK2V617F</i> ou outro marcador clonal <p style="text-align: center;">ou</p> Sem evidência de fibrose medular reativa	1) Leucoeritroblastose 2) Aumento sérico de LDH 3) Anemia 4) Esplenomegalia palpável

É necessária a presença dos três critérios maiores e dois critérios menores.

Para determinar a estratificação de risco dos pacientes com MFP, o International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT) descreveu o International Prognostic Scoring System (IPSS) utilizado para avaliação do paciente ao diagnóstico. Subsequentemente, o mesmo grupo descreveu o Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS), que é utilizado para estimar a sobrevida do paciente em qualquer período da doença. O DIPSS também permite prever o risco de progressão para leucemia mielóide aguda. A figura 1 mostra os fatores que são analisados para determinação do risco. ^{14, 15}

IPSS e DIPSS compartilham os mesmos fatores de risco	Cada Fator de Risco Corresponde a um Valor de Ponto	
	IPSS	DIPSS
Idade > 65 anos	1	1
Presença de sintomas constitucionais	1	1
Hemoglobina < 10g/dL	1	2
Contagem de Leucócitos > $25 \times 10^9/L$	1	1
Blastos no sangue periférico $\geq 1\%$	1	1

Grupo de Risco	Cada Grupo de Risco Corresponde a uma Contagem		
	Contagem de IPSS	Média de sobrevida (anos) baseada no IPSS	Contagem de DIPSS
Baixo	0	11.25	0
Intermediário 1	1	7.92	1-2
Intermediário 2	2	4.00	3-4
Alto	≥ 3	2.25	5-6

Figura 1: IPSS e DIPSS para Mielofibrose primária.¹⁵

1.2. Alterações genéticas nas NMP

1.2.1. Via JAK-STAT

Em células normais, a ativação de proteínas STATs (sinais de transdução e ativadores de transcrição) provê estímulos para proliferação celular, sobrevivência, auto-renovação, diferenciação e ativação funcional. Nas células leucêmicas e outros cânceres, as STATs ficam ativadas de forma constante sem a estimulação de citocinas, promovendo a sobrevivência e proliferação de células leucêmicas.¹⁶

A principal forma de ativação descontrolada de STATs é a desregulação de tirosina-quinase. A ligação de citocinas em seus receptores leva a fosforilação de tirosinas quinases como JAK, e essas levam a ativação de STATs, que são fosforiladas e assim se desligam do receptor, formando dímeros. A forma dimérica pode se locomover para o núcleo, onde se liga ao DNA e promove a transcrição de genes responsáveis pela proliferação celular e genes anti-apoptóticos.¹⁶

A ativação de JAK, por sua vez, estimula a proliferação celular, diferenciação, migração celular e apoptose. Esses eventos celulares são essenciais para desenvolvimento hematopoiético imune, desenvolvimento da glândula mamária e lactação, adipogênese e outros processos.¹⁷

A família de Janus quinases é composta por *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* e *TYK2*. Essas tirosina quinases apresentam estrutura bem definida, que é semelhante a todas e bem diferenciada em relação a outras tirosinas quinases. A principal diferença está relacionada com a presença de sete domínios homólogos de JAK (JH1 a JH7) e a ausência de domínios homólogos de ligação ao Scr (SH2 ou SH3).¹⁸

Figura 2: Representação da estrutura de JAK.¹⁸

Os dois domínios JH carbóxi-terminais, são os domínios que retêm a alta homologia com as tirosinas quinases. Apenas o primeiro retém a função, o outro, por perder alguns aminoácidos essenciais para atividade, é chamado domínio

pseudoquinase e este parece ser o responsável pela regulação negativa de JH1.^{18,19}

Apesar de não apresentar um domínio SH2 ou SH3 como outras tirosinas quinases, a ligação ou interação com outras proteínas se dá na região JH3, que funciona como um resíduo SH2. A região entre JH4 e JH7 é caracterizada como uma região amino-terminal, denominada FERM, que contém domínios de erzina, radixina e moesina compartilhados com a família FAK (quinase de adesão focal) que é responsável pela ligação aos receptores.¹⁶

A sinalização de JAK acontece por auto ou transfosforilação. Os ligantes quando se ligam ao receptor levam à oligomerização e o recrutamento de JAK onde se ligam através de seu domínio FERM. A justaposição dos JAKs resulta em auto fosforilação, que por sua vez leva à fosforilação de moléculas que contém domínios de ligação SH2, incluindo as STATs, assim como outras moléculas adaptadoras e fosfoquinases. Após a fosforilação, as STATs se dimerizam e se deslocam para o núcleo, onde interagem com elementos regulatórios específicos que induzem a transcrição gênica.^{18, 20}

O controle da sinalização inclui fosforilação direta por tirosinas fosfatases homólogas ao Src (SHP-1), inibição por supressores de sinalização de citocinas (SOCS), por ligação direta a tirosina 1007 de *JAK2* e pela competição pela ligação aos sítios de STATs, como proteínas inibidoras de STATs ativadas (PIAS).¹⁸

SHP-1, membro da família SHP, é uma proteína citoplasmática com ação de tirosina fosfatase e contém dois domínios SH2 que podem se ligar tanto aos receptores fosforilados de JAK quanto aos JAKs fosforilados, facilitando a desfosforilação dessas moléculas de sinalização.^{17,21}

As proteínas de SOCS são uma família de oito membros contendo domínio SH2 e resíduo C-terminal "SOCS box". As SOCS exercem um feedback negativo na cascata JAK-STAT, onde STATs ativadas estimulam a transcrição de genes SOCS e as proteínas resultantes de SOCS se ligam as JAKs fosforilados e seus receptores, levando à sua inibição. A inibição provocada por SOCS pode acontecer de três formas principais. A primeira envolve o bloqueio

de sinalização de STATs pela interação com fosfotirosinas nos receptores. A segunda envolve a ligação direta de SOCS aos receptores de JAK e a terceira envolve a interação de SOCS com complexo BC elongin e cullin 2, facilitando a ubiquitinação de JAKs, e consequentemente, de seus receptores.^{17, 21}

A terceira classe de reguladores negativos são as proteínas PIAS, onde se incluem as PIAS1, PIAS3, PIASx e PIASy. Estas proteínas apresentam domínio de ligação Zinc-finger na região central, domínio SAP (SAF-A/acinus/PIAS) no domínio N-terminal e um domínio C-terminal menos conservado. Os domínios N e C-terminal estão envolvidos nas ligações com proteínas alvo. As PIAS se ligam as STATS já dimerizadas e ativas, impedindo sua ligação ao DNA.^{17, 22}

1.2.2. *JAK2*

Em humanos, o gene *JAK2* reside no cromossomo 9p24. O *JAK2* apresenta papel importante na eritropoiese, pela interação com receptores de eritropoetina (EPO), além da interação com interferons tipo I e II e com interleucina 3 (IL-3), também denominada multi-CSF, que é um fator estimulador de todas as linhagens hematopoiéticas, aumentando a proliferação das células mielóides precursoras (eritroblásticas, mielomonocíticas e megacarioblásticas).¹⁶

A presença de mutação em *JAK2* foi descrita inicialmente em 2005 onde 95% dos pacientes com PV e 50% dos pacientes com TE ou MFP apresentavam a troca de uma guanina por uma timina no códon 617, resultando na substituição da valina por uma fenilalanina. A mutação *JAK2V617F* acarreta na ativação constitutiva da via JAK-STAT levando a proliferação celular descontrolada e independente de estímulos externos provenientes de citocinas.^{4, 5} Além da

mutação *JAK2*V617F que ocorre com certa frequência, outras duas alterações genéticas foram reportadas, como a presença de mutações no exon 12 que ocorre em 4% dos pacientes com PV, sendo que 30% dessas mutações é do tipo N542-N543del²³ e a outra alteração é a mutação *JAK2*Y931C, que confere resistência aos inibidores de *JAK1* e *JAK2* como o ruxolitinibe utilizado no tratamento da MFP.²⁴

Estudos recentes mostram ainda a presença de mutações do exon 12 ao exon 15 de *JAK2*, acontecendo principalmente no domínio pseudo-quinase (JH2) da molécula, como mostra a figura 3, abaixo.^{19,25}

Figura 3: Identificação de todas as mutações encontradas nos exons 12 ao 15 na estrutura de *JAK2*.¹⁹

Estas mutações não parecem representar polimorfismos, mas sim mutações pontuais, exceto pela deleção de um único nucleotídeo em F557 que elimina o exon 14 inteiro. A deleção de um nucleotídeo (T) no exon 13 leva a mutação F557L (TTT para TTA) com uma terminação reduzida no resíduo 567.

Esta mutação é particularmente interessante porque causa mudanças significativas na proteína de *JAK2*.²⁵

1.2.3. Mutação *JAK2*V617F

Em 2005, observou-se que grande parte dos pacientes classificados com doenças mieloproliferativas e Ph negativo, apresentavam a mutação somática V617F no exon 14 de *JAK2*, sendo apresentada em mais de 95% dos casos de PV, 50% dos casos de TE e também em 50% dos casos de MFP, sugerindo que esta mutação pode desempenhar um papel importante na auto-regulação de *JAK2*.⁴

A mutação *JAK2*V617F é uma mutação com ganho de função de tirosina-quinase resultado de uma troca de guanina para timina no nucleotídeo 1849 com a substituição de uma valina para uma fenilalanina no códon 617. Esta mutação acarreta na ativação persistente da via JAK-STAT, que leva a um crescimento celular independente de estímulos provenientes de citocinas, já que a mutação acontece no domínio pseudoquinase de *JAK2* que controla a atividade de tirosina quinase do domínio quinase da molécula.⁴

Figura 4: Sinalização de *JAK2V617F*.¹⁸

Neste caso, o receptor homodímero de *JAK2*, localizado no domínio justamembrana é ativado sem a ligação de citocinas, o que acarreta na fosforilação de resíduos de tirosina no domínio TpoR no citosol, que recruta uma série de proteínas de sinalização, como STAT5 e STAT3, que se tornam substratos de *JAK2*, onde se dimerizam e se desligam do receptor indo para o núcleo onde regulam a expressão gênica. A fosforilação e ativação de *JAK2* também leva a ativação de outras cascatas de sinalização celular como fosfatidilinositol-3' quinase (PI-3'K)/AKT/mTOR e RAS-MAP-kinase. A integração desses sinais no núcleo, induz sobrevivência, proliferação e diferenciação de progenitores mielóides.¹⁸

1.2.4. Mutações *JAK2* exon 12

Mais recentemente foram descritas mutações no exon 12 de *JAK2* em pacientes com PV e *JAK2*V617F negativos. Estas mutações, que afetam os resíduos de aminoácidos F537-E543, se localizam em uma região altamente conservada próxima ao domínio JH2 da molécula de *JAK2* e resulta em ativação constitutiva da via JAK-STAT assim como acontece na mutação *JAK2*V617F.²⁶

As mutações no exon 12 ocorrem em aproximadamente 4% dos pacientes com PV, sendo que 30% dessas mutações é do tipo N542- E543del, seguida de E543-D544del (11%), F537-K539delinsL e K539L (10%) e R541- E543delinsK (8%).²⁷

1.2.5. Mutações resistentes de *JAK2*

Estudos mostram que apesar da mutação V617F de *JAK2* ser uma das mais frequentemente encontradas, existe ainda várias outras mutações encontradas nos domínios quinase e pseudo-quinase de *JAK1* e de *JAK2* em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide aguda (LMA) e câncer de mama, bem como mutações em *JAK3* em pacientes com leucemia megacarioblástica aguda.^{28,29}

Em *JAK2*, além da mutação V617F encontrada na maior parte dos pacientes, um estudo mostra a presença da mutação Y931C, que permite a proliferação celular autônoma por ativar de forma constante a via JAK-STAT. Além disso, essa mutação permite resistência aos inibidores de JAK como o INCB018424 e CMP6 que inibem a fosforilação de STAT3, que seriam importantes para pacientes que adquirem resistência aos inibidores de tirosina quinase,

diferentemente da mutação V617F que é sensível aos inibidores testados (INCB018424 e CMP6). O estudo ainda permite observar que na presença das duas mutações de forma concomitante, o paciente aumenta ainda mais a capacidade de resistência aos inibidores.^{29, 30}

1.3. Outras mutações mutuamente independentes – *MPL* e *CALR*

1.3.1. Mutações em *MPL*

O gene humano c-*MPL* (myeloproliferative leukemia vírus oncogene), um homólogo celular do oncogene v-*MPL*, pertence a super família de receptores hematopoiéticos. A proteína codificada pelo *MPL*, CD110, é uma proteína de 635 aminoácidos composta de quatro domínios funcionais: o domínio peptídico de sinalização, o domínio extracelular, o domínio transmembrana e o domínio intracelular. Esses domínios correspondem aos exons, 1, 2-9, 10 e exon 11-12, respectivamente. Na ausência da ligação de CD110, a trombopoetina (TPO) nos domínios extracelulares e transmembrana, retém CD110 no estado inativo.³¹

Quando TPO se liga a CD110, esta última se dimeriza e ativa as tirosinas quinases *JAK2* e *Tyk2*, que por sua vez ativam a sinalização de uma série de cascatas, incluindo *STATS*.³¹

A proliferação e diferenciação de megacariócitos e o desenvolvimento de plaquetas são regulados pela trombopoetina, que interage com seu receptor *MPL*, que induz sinalização através da cascata *JAK/STAT*.³¹

Várias mutações em *MPL* alteram os mecanismos regulatórios normais: algumas causam perda total ou parcial da função de CD110, levando a

trombocitopenia, enquanto outras mutações resultam em ativação autônoma de CD110 e o desenvolvimento de trombocitose. As diferentes mutações existentes estão demonstradas na tabela 6 e na figura 5, a seguir.³¹

Tabela 6: Classificação e características clínicas das mutações em *MPL* identificadas em doenças hematopoiéticas.³¹

Tipos de Mutação	Mutação e padrão hereditário	Efeito	Manifestação clínica	Doença (taxa mutacional)
Tipo 1: 41 tipos diferentes de mutação em <i>MPL</i> em Trombocitemia amegacariocítica congênita (CAMT)	Mutação autossômica recessiva germinativa	Perda completa ou redução significativa da função de <i>MPL</i>	Trombocitopenia	CAMT (aprox. 91,8%)
Tipo 2: S505N	Mutação autossômica dominante germinativa, mutação somática rara	Ativação autônoma da função de <i>MPL</i>	Trombocitose	Trombocitemia hereditária (aprox. 54,5%)
K39N, P106L	Mutação autossômica dominante germinativa com penetrância incompleta e autossômica recessiva com possível manifestação heterozigota moderada	Redução da afinidade de ligação com trombopoetina	Trombocitose	Trombocitemia hereditária (7% dos indivíduos americanos e africanos e 6% dos indivíduos árabes)
Tipo 3: W515L/K	Mutação somática	Ativação autônoma da função de <i>MPL</i>	Trombocitose	NMPs (aprox. 1% em TE e 5% em MFP, rara em PV), LMA M7 com mielofibrose (aprox. 25%), rara em RARS-t
Tipo 4: W515A/R, T487A, Y25H	Mutação somática	Ativação autônoma da função de <i>MPL</i>	Trombocitose	Rara em NMPs, LMA M7 e TE, respectivamente
A519T, L510P e A506T	Mutação somática	Sem função ou pode regular outros eventos genéticos	Desconhecido	Rara em MFP
W515-P518delinsKT, Y591D, S204P/F, IVS 11/12 e MS 10/11	Mutação somática	Não esclarecido	Desconhecido	Rara em NMPs

Figura 5: Resumo esquemático dos mecanismos das diferentes mutações no gene *c-MPL* humano com efeitos biológicos distintos.³¹

Sabe-se desta forma, que nas mutações do tipo 1 (CAMT), a mutação leva a inibição de todas as cascatas e portanto a perda da função de *MPL*. Já as outras mutações levam a estimulação das cascatas sem a necessidade da ligação da trombopoetina.³¹

As substituições em W515 são as mutações que afetam o exon 10 de *MPL* e que são encontradas em aproximadamente 9% dos pacientes com mielofibrose *JAK2V617F* negativos e em 1 a 5% dos pacientes com trombocitemia essencial, não sendo encontradas em pacientes com policitemia vera. As mutações *MPL-W515L/K* estão associadas com neoplasias mieloproliferativas crônicas, RARS-t (Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis) e LMA. Essas duas mutações são consideradas de grande importância diagnóstica já que foram incluídas como fatores diagnósticos pela Organização Mundial de Saúde em 2008 para NMPs. A mutação W515L, com ganho de função, é a substituição de um triptofano por

uma leucina no códon 515, o que leva a um crescimento independente de citocinas, além de fosforilação de *JAK2*, *STAT3*, *STAT5*, assim como proteínas de *ERK* e *AKT*.^{31, 32}

Estudos na estrutura do receptor de trombopoetina indicam que os aminoácidos do resíduo W515 estão localizados na região citoplasmática justamembrana da proteína, o que previne a ativação espontânea do receptor na ausência do ligante. Apesar disso, mutações em *MPL* – W515L/K podem causar ativação espontânea. Em estudos in vitro, várias cascatas de sinalização são constitutivamente fosforiladas e a fase S do ciclo celular está aumentada em linhagens celulares contendo mutações *MPL*- W515L/K.^{32, 33}

Comparado com mutações em *MPL*-W515L/K, mutações em *MPL*-W515A/R são significativamente menos frequentes. Entretanto, parece que as mutações em *MPL*-W515A/R funcionam com mecanismo similar ao das mutações *MPL*-W515L-K, já que são mutações no mesmo aminoácido.³¹

1.3.2. Calreticulina (*CALR*) e mutações

Os sinais de Ca^{2+} controlam importantes funções biológicas, incluindo fertilização, desenvolvimento, contração cardíaca, além da secreção de neurotransmissores e hormônios. Ao nível celular, Ca^{2+} pode ser também considerado um sinal de morte, já que as concentrações de Ca^{2+} livres no citosol podem tanto controlar o crescimento celular e proliferação, quanto podem induzir a apoptose. O principal estoque de Ca^{2+} celular acontece no retículo endoplasmático, mas a mitocôndria também exerce esse papel de forma eficiente.³⁴

A concentração reduzida de Ca^{2+} no retículo endoplasmático é observada em células que expressam altas concentrações da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Já o efeito oposto é observado em células que expressam altas concentrações de Ca^{2+} ATPases, como *SERCA2b* ou calreticulina, responsáveis pelo aumento

da concentração de Ca^{2+} no retículo endoplasmático. Sendo assim, células sem calreticulina são mais resistentes a estímulos apoptóticos.³⁴

A calreticulina é uma proteína de 46kDa que interage com várias proteínas dependentes de Ca^{2+} , com glicoproteínas, e com transportadores de Ca^{2+} para o retículo endoplasmático, sendo composta estruturalmente por três domínios funcionais, que se seguem:

Figura 6: Efeito dos domínios da Calreticulina.³⁴

Como se observa nas figuras 6, acima e 7, a seguir, a calreticulina apresenta um domínio N-terminal bem conservado, que está relacionado com funções de interação com outros domínios semelhantes do retículo endoplasmático, com pontos de ligação a oligossacarídeos monoglicosilados e apresenta estrutura globular com oito fitas beta antiparalelas conectadas com loops de proteínas. Um domínio P, que forma um hairpin rico em prolina, que divide uma significativa identidade em relação a sequência de aminoácidos com a calnexina, calmegina e CALNUC, e que está envolvida na função de interação com outras proteínas e ligação ao Ca^{2+} com alta afinidade e capacidade e um domínio C-terminal, caracterizado por um formato de alfa-hélice que se liga aos

íons de Ca^{2+} com baixa afinidade, mas é importante para manter o estoque de Ca^{2+} no retículo endoplasmático. O domínio C-terminal parece funcionar como um sensor de Ca^{2+} e acaba regulando a interação da calreticulina com outras proteínas.^{35, 36, 37, 38}

Estudos mostram a presença de 36 tipos de mutações encontradas no exon 9 de *CALR* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas. Todas as mutações levam a um frameshift, que é a mudança da leitura dos nucleotídeos. Com as mutações pode haver 2 novas formas de leitura, o que resulta na produção de proteínas de *CALR* com um número de aminoácidos positivos no C-terminal, enquanto o não mutado é carregado negativamente. Sabe-se ainda que o C-terminal KDEL (endoplasmic reticulum retention motif) é perdido em todas as mutações, o que impede a regulação da calreticulina com outras proteínas e consequentemente a regulação de cálcio no retículo endoplasmático.

Figura 7: Alteração de frameshift com novo C-terminal associado com mutações em *CALR*.⁴⁰

A figura 7 mostra os domínios funcionais da proteína de *CALR* (calreticulina). As sequências mostradas em preto são as regiões conservadas e as em azul são as regiões parcialmente conservadas. Como se pode observar, a figura também mostra a alteração do frameshift quando se tem deleções ou inserções no exon 9 de *CALR*.⁴⁰

As principais mutações do exon 9 de *CALR* são as do tipo 1, caracterizada pela deleção de 52pb (53%) e a do tipo 2, que envolve a inserção de 5pb

(31,7%). No tipo 1 elimina-se quase todos os aminoácidos de carga negativa, enquanto que no tipo 2 retém-se aproximadamente metade dos aminoácidos negativos. Além disso, dentre as neoplasias mieloproliferativas crônicas, as mutações do tipo 1 são mais frequentes em mielofibrose primária do que em trombocitemia essencial.^{39, 40}

Além desses dois tipos mais comuns ainda se tem mutações do tipo 3 (1,7%), do tipo 4 (1%), dos tipos 5-10 (cada um com 0,7%) e dos tipos 11-36 (cada um com 0,3%).^{39, 40}

1.4. Alterações epigenéticas

A regulação da transcrição pode ser realizada através de mecanismos epigenéticos, que envolvem modificações de citocinas no DNA ou em histonas. A metilação e hidroximetilação de citosinas no DNA, assim como a metilação, acetilação e outras modificações de histonas, são os mecanismos mais comuns de levar a repressão da transcrição gênica. Esses processos apresentam um papel importante na diferenciação celular, já que eles podem regular a expressão de genes sem afetar a sequência de DNA. Essas modificações são também reversíveis, o que as tornam alvos potencialmente terapêuticos.⁴¹

Mutações somáticas em modificadores epigenéticos são encontradas em todas as neoplasias mielóides, e afetam principalmente os genes *TET2*, *IDH1*, *IDH2* e *ASXL1*.⁴¹

1.4.1. *IDH1* e *IDH2*

Isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1/2*) são enzimas dependentes de NADP^+ , que participam do ciclo do ácido cítrico catalisando a conversão de isocitrato para α -cetoglutarato, sendo que *IDH1* atua no citoplasma, onde catalisa o metabolismo e sensibilidade a glicose e *IDH2* atua na mitocôndria, onde regula a respiração oxidativa. ^{41, 42, 43}

Mutações somáticas que afetam os genes *IDH1* e *IDH2* foram inicialmente descritos em gliomas e leucemia mielóide aguda. Todas as mutações observadas são heterozigotas e ocorrem em posições altamente conservadas. A incidência das mutações tanto em *IDH1* quanto em *IDH2* nas neoplasias mieloproliferativas crônicas são estimadas em: 0,8% em trombocitemia essencial, 1,9% em policitemia vera, 4,2% em mielofibrose primária e 21% em casos de leucemia mielóide aguda como consequência de progressão das neoplasias mieloproliferativas crônicas. Essas mutações podem acontecer na presença ou ausência de mutações em *JAK2V617F*. ^{44, 45, 46}

As mutações em *IDH1* afetam o resíduo de arginina na posição 132 do exon 4, e seu análogo em *IDH2*-R172, indicando ganho de função. Mutações na posição R140 de *IDH2* também foram reportadas. Mutações em *IDH2* são mais comuns que em *IDH1*, e as duas são sempre mutuamente exclusivas. Tanto as mutações em *IDH1* quanto em *IDH2* estão relacionadas com redução da sobrevivência global em pacientes com mielofibrose primária na presença de *JAK2V617F*. ^{44, 45}

Vários grupos de pesquisa mostraram que as mutações em *IDH* levam a conversão de α -cetoglutarato em 2-hidroxiglutarato (2HG) de forma dependente de NADPH , perdendo a capacidade dessas enzimas em utilizar o isocitrato como substrato. Como *TET2* precisa de α -cetoglutarato como cofator, mutações em *IDH1/2*, inibem a atividade de *TET2*, o que resulta na redução de hidroximetilação de 5-metil-citosinas e demetilação. Essa relação explica a baixa incidência de coocorrência de mutações entre *IDH1/2* e *TET2*. ^{47, 48}

Além disso, o aumento da concentração de 2HG também leva a inibição de enzimas dependentes de α -cetoglutarato, assim como a família de demetilases de histonas como Jumonji de domínio C-terminal, o que parece ser mais um mecanismo para leucemogênese.^{49, 50}

Figura 8: Funções normais de *IDH* para conversão de isocitrato em α -cetoglutarato.⁴⁶

1.4.2. *TET2*

As proteínas TET (*TET1*, 2 e 3) são enzimas que catalisam a conversão de citosinas 5-metiladas em citosinas 5-hidroximetiladas (5HMC) e requerem Fe(II) e α -cetoglutarato como cofatores. Existem evidências de que 5HMC pode ser tanto uma fase intermediária no processo de demetilação de citosinas quanto pode ser uma modificação associada com de-repressão de genes.^{41, 51}

Deleções na região cromossômica 4q24, onde se encontra o gene *TET2* são observadas em várias neoplasias mielóides. Análises de sequenciamento mostram que também é comumente encontrado nesse gene mutações pontuais ou frameshifts, afetando principalmente exons 3 (41%) e 11 (29,1%), levando a perda de sua função enzimática. Sendo assim, as mutações em *TET2* podem acontecer em todos os exons, podem ser substituições missense ou nonsense, splice sites, inserções ou deleções resultando em frameshifts ou stop códons.^{52, 53, 54}

A figura 9 abaixo mostram as principais mutações encontradas nos exons 3 a 11 de *TET2* nos pacientes com neoplasias mieloproliferativas.

1.4.3. ASLX1

ASLX1 (Additional sex comb like 1 gene) codifica uma proteína nuclear de 1084 resíduos (*ASXL1*) caracterizada por um domínio N-terminal helix-turn-helix, denominado HARE-HTH e um homodomínio C-terminal (PHD), que pode se ligar a lisinas metiladas. A porção central da proteína contém um domínio globular que pode interagir com deubiquitinase associada a família polycomb (DUB), que pode agir tanto como ativadora quanto repressora da transcrição através de uma série de mecanismos, principalmente envolvendo modificações de histonas. Estudos recentes mostram que *ASLX1* interage com os componentes do complexo polycomb PRC2, conhecidos como *EZH2* e *SUZ12*, duas proteínas envolvidas na deposição e repressão de H3K27me3 inibindo a transcrição. Estes dois componentes da família polycomb também estão mutados nas doenças mielóides. Apesar das funções de *ASXL1* estarem relacionadas com o complexo PRC2, que inclui *EZH2*, as mutações nestes dois genes não são mutuamente exclusivas.^{56, 57}

Mutações em *ASLX1* são principalmente heterozigotas, nonsense e frameshift, ocorrendo predominantemente no exon 12 e levando a perda da região C-terminal da proteína. As mutações são encontradas em 34,5% dos pacientes com mielofibrose primária, 36% dos pacientes com mielofibrose secundária à policitemia vera, 50% dos pacientes com mielofibrose secundária à trombocitemia essencial e são raramente encontradas em pacientes com trombocitemia essencial ou policitemia vera. Não se sabe ainda se essas mutações levam a perda ou ganho de função e seu valor prognóstico ainda não está estabelecido.^{58, 59, 60}

2. OBJETIVOS

- Estabelecer um perfil genético em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas através da avaliação de mutações nos genes *JAK2*, *MPL*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2* e *ASXL1*;
- Estabelecer uma correlação laboratorial destas na Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de sangue de 104 pacientes, destes 15 com PV, 20 com MFP, 20 com TE e 49 com outros diagnósticos, que foram enviadas para o Laboratório de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para investigação diagnóstica. Dentre os pacientes com outros diagnósticos, têm-se 3 com LMC, 2 com LMA M4 (leucemia mielomonocítica crônica), um com LMA, um com Linfoma de Burkitt, 8 com SMD (síndrome mielodisplásica), 5 com síndrome de Budd-Chiari e 22 com alterações como trombose e poliglobulia para investigação diagnóstica.

A análise dos dados clínicos e hematológicos foi realizada através dos prontuários dos pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo. Este projeto foi aprovado pela CAPPesp e está gravado no CAPPesp On-Line pelo número 9675 de 2012.

3.1. Extração de DNA e RNA e Síntese de cDNA

A extração de DNA e RNA foi realizada em todas as amostras de sangue periférico. A extração de DNA foi realizada com o kit Purelink Genomic DNA mini kit® (Invitrogen/ USA) seguindo as orientações do fornecedor. Já a extração de RNA foi realizada através do protocolo do reagente Trizol® (Invitrogen/USA) de acordo com as orientações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA através do kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™/USA) conforme o protocolo do fabricante.

3.2. Detecção de *JAK2V617F* por PCR-RFLP

A mutação de *JAK2V617F* foi analisada através da técnica de PCR-RFLP. De maneira resumida, a reação de PCR foi realizada com 180ng de DNA, 2,5 µL Tampão de Reação 5X, 0,5µL dNTP 10mM, 0,75µL MgCl₂ 25 mM, 1,0µL Primer 10pmoles (5´TGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGCAT3´ e 5´TCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCAA3´)⁶¹, 0,15µL Enzima Taq DNA Polymerase Platinum (InvitrogenTM/USA) 5U/µl e água Milli-Q / ultrapure para um volume final de 25µL. O programa de amplificação consiste em: 95°C por 2min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 1min e 72°C por 1min e ciclo final de 72°C por 5min. Após o término da reação, 6 µl do produto final da reação foram submetidos a digestão com 1 µl da enzima BSAXI (Biolabs TM/ New England), 2 µl de Tampão Reação 10X e água ultra-pura até o volume de 20 µl. Após a digestão, os produtos da PCR não digerido e digerido foram submetidos à corrida por eletroforese em gel de agarose a 2%.

3.3. Sequenciamento direto – Técnica de Sanger

Os genes *JAK2Y931C*, *JAK2* exon 12, *MPL*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2* e *ASXL1* foram inicialmente aMPLificados utilizando-se a 0,2µL de enzima Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen, USA), 2,5 µl de Tampão de Reação 10 X, 0,5µL dNTP 10mM, 1µL MgCl₂ 50mM, 1,0µL de cada um dos primers a 10pmol, como descrito para cada gene na tabela 7, e Água Milli-Q / ultrapura até o volume de 23 µl, sendo que o programa de amplificação para *JAK2Y931C*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2* e *ASXL1* é o mesmo: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 1min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 5 min. O programa de amplificação do *MPL* é de 94°C por 1 min, 39 ciclos de 58°C por 1 min, 72°C por 2 min, 58°C por 1 min e 72°C por 2 min. Para as mutações em *JAK2* exon 12, o

protocolo de amplificação é similar ao do *JAK2*V617F. Após a amplificação as amostras foram purificadas com ExoSAP-IT (Affymetrix/ USA) e posteriormente sequenciadas utilizando o kit BigDye® v3.1 (BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems/USA) segundo instruções do fabricante. Após, as reações de sequenciamento foram submetidas a eletroforese capilar no ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems/ USA) usando protocolo padrão e analisadas através do software Mutation Surveyor ® v4.0.5 (Soft Genetics, LLC. State College, USA).

Tabela 7: Sequências dos primers para PCR e sequenciamento.

Gene	Primer F	Primer R
<i>JAK2</i> (Y931C)²⁸	5'CCTGAAATCCCTACAGCATGA3'	5'AGGCCACAGAAAACCTTGCTC3'
<i>JAK2</i> (exon 12)⁶²	5'CTCCTCTTTGGAGCAATTCA3'	5'GAGAACTTGGGAGTTGCGATA3'
<i>MPL</i>⁶³	5'GGTGACCGCTCTGCATCTAGTGCT3'	5'CACCTGGTCCACCGCCAGTCT3'
<i>IDH1</i>⁶⁴	5'TGTGTTGAGATGGACGCCTA3'	5'GGTGTA CTAGAGCCTTCGC3'
<i>IDH2</i>⁶⁴	5'CTCCCTCTTTGTGGCCTAAG3'	5'ATTCTGGTTGAAAGATGGCG3'
<i>ASXL1</i>⁶⁵	5'CCACCCTGGGTGGTTAAAG3'	5'TCGCTGTAGATCTGACGTAC3'
<i>TET2</i> (exon 3 PCR1)⁶⁶	5'TGAACTTCCCACATTAGCTGGT3'	5'GAAACTGTAGCACCATTAGGCATT3'
<i>TET2</i> (exon 3 PCR2)⁶⁶	5'CAAAAGGCTAATGGAGAAAGACGTA3'	5'GCAGAAAAGGAATCCTTAGTGAACA3'
<i>TET2</i> (exon 3 PCR3)⁶⁶	5'GCCAGTAACTAGCTGCAATGCTAA3'	5'TGCCTCATTACGTTTTAGATGGG3'
<i>TET2</i> (exon 3 PCR4)⁶⁶	5'GACCAATGTCAGAACACCTCAA3'	5'TTGATTTTGAATACTGATTTTCACCA3'
<i>TET2</i> (exon 3 PCR5)⁶⁶	5'TTGCAACATAAGCCTCATAAACAG3'	5'ATTGGCCTGTGCATCTGACTAT3'
<i>TET2</i> (exon 3 PCR6)⁶⁶	5'GCAACTTGCTCAGCAAAGGTACT3'	5'TGCTGCCAGACTCAAGATTTAAAA3'
<i>TET2</i> (exon 11 PCR1)⁶⁶	5'GCTCTTATCTTTGCTTAATGGGTGT3'	5'TGTACATTTGGTCTAATGGTACAAGT3'
<i>TET2</i> (exon 11 PCR2)⁶⁶	5'AATGGAAACCTATCAGTGGACAAC3'	5'TATATATCTGTTGTAAGGCCCTGTGA3'

3.4. Análise de fragmentos

A identificação de mutações no exon 9 do gene *CALR* foi realizada através da técnica de análise de fragmentos. Resumidamente, 10 ng de DNA genômico foram amplificadas com o seguinte protocolo: 5 µl de Tampão de Reação 10 X, 1 µL dNTP 10mM, 3 µL MgCl₂ 50mM, 2,5 µL de cada um dos primers a 10pmol, sendo o F marcado com FAM (5' FAM- 5GGCAAGGCCTGAGGTGT3') e o R sem marcação (5' GGCCTCAGTCCAGCCCTG3')³⁹, 0,2 µl enzima AmpliTaq Gold DNA Polimerase 5U/µl (Applied Biosystems/USA) e Água Milli-Q / ultrapura até o volume de 50 µl. Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 95°C por 10min, 10 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 15s e 72°C por 30s, 20 ciclos de 89°C por 15s, 55°C por 15s e 72°C por 30s, seguida de 72°C por 20min e 10°C por 30min.

Para realização da análise de fragmentos, utilizou-se 1,0 µL de produto de PCR, 0,75 µL GeneScan™ 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems/ UK) e 8,25 µL Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems/ USA) para um volume final de 10µL e as amostras foram submetidas, em seguida, a eletroforese capilar em 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/ USA) utilizando o protocolo padrão e finalmente analisadas com Gene Mapper® ID V3.2 software (Biosystems/ USA).

3.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando SPSS 16.0 (IBM, USA) com valores de P bicaudais e a diferença estatística foi fixada com níveis de P<0,05.

Variáveis contínuas foram sumarizadas como medianas e variações. As variáveis categóricas foram descritas como contagem e frequência relativa (%). Comparação entre variáveis categóricas e contínuas foram realizadas pelo Mann-Whitney *U*-test.

4. RESULTADOS

Foram analisadas amostras de sangue periférico de 104 pacientes (51 mulheres e 53 homens), com média de idade de 58 anos (16-92), sendo que destes 15 apresentavam policitemia vera (14,4%), 20 apresentavam mielofibrose primária (19,2%), 20 apresentavam trombocitemia essencial (19,2%), 15 apresentavam outras leucemias, como LMA, LMC, LMMC ou síndrome mielodisplásica (14,4%) e 34 não tiveram diagnóstico definido ou outros diagnósticos, como anemia, infarto agudo do miocárdio, entre outros e foram incluídos no mesmo grupo como suspeita de neoplasias mieloproliferativas (32,7%).

As características hematológicas desses pacientes encontram-se na tabela 8 abaixo.

Tabela 8: Características hematológicas dos pacientes estudados.

Doenças	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (mil/mm³)	Plaquetas (mil/mm³)
PV mediana (mín - max)	16,06 (10,6 - 21,5)	50,64 (36,6 - 67,8)	18,34 (4,015 - 85,6)	481,8 (52 - 887)
TE mediana (mín - max)	13,36 (8,7 - 17)	40 (24,8 - 49)	13,06 (4,28 - 39,3)	821,35 (108 - 1445)
MFP mediana (mín - max)	10,08 (4,9 - 16,1)	31,2 (14,7 - 45,9)	12,26 (1,35 - 66,2)	442,07 (43,3 - 1660)
SMD/ Leucemias mediana (mín - max)	10,45 (4,8 - 17,8)	32,21 (14 - 62,2)	11,19 (2,15 - 67,33)	334,23 (17 - 1957)
Suspeita NMP mediana (mín - max)	14,5 (5,8 - 20,9)	43,87 (19,5 - 64,1)	9,73 (2,42 - 29,27)	291,95 (17,39 - 1963)

Como se observa acima, os pacientes com PV apresentam a maior mediana para hemoglobina, como era esperado pela característica da doença,

já que este é um dos critérios diagnósticos a serem analisados, assim como os pacientes com TE apresentam os maiores níveis de plaquetas quando comparado aos outros grupos analisados.

Já em relação a avaliação das características clínicas desses pacientes de acordo com as doenças, tem-se 19 casos de esplenomegalia no total, sendo que destes, 3 casos positivos em PV (20%), 14 casos positivos em MFP (70%) e 2 casos positivos para pacientes com TE (10%) e não houve diferença estatística entre os grupos. Nenhum caso foi encontrado nos pacientes com outros diagnósticos diferentes de NMP.

Todas as amostras foram submetidas à análise de mutações em *JAK2V617F*, *JAK2Y931C*, *JAK2* exon 12, *MPL*, *CARL*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1* e *TET2* para avaliação do perfil genético desses pacientes.

4.1. Frequência das mutações encontradas

Avaliando os 104 pacientes, observa-se 30 pacientes positivos para mutação em *JAK2V617F* (30%), 4 para *JAK2Y931C* (3,9%), nenhum positivo para *MPL*, 9 positivos para mutações em *IDH1* (8,7%), 5 positivos para mutações em *IDH2* (4,8%), 13 positivos para mutações em *ASXL1* (12,5%), um caso positivo para mutações no exon 12 de *JAK2* (1%), 8 casos positivos para mutações em *CALR* (7,7%) e 33 positivos pra mutações em *TET2* (31,7%).

Tabela 9: Resumo das frequências das mutações.

Frequência Mutações	Doenças				
	PV	TE	MFP	SMD/Leucemia	Suspeitas de NMP
JAK2V617F (%)	12 (80)	11 (55)	7 (35)	0 (0)	0 (0)
JAK2Y931C (%)	1 (6,7)	2 (10)	1 (5)	0 (0)	0 (0)
JAK2 Exon12 (%)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CALR (%)	0 (0)	3 (15)	5 (25)	0 (0)	0 (0)
MPL (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IDH1 (%)	0 (0)	2 (10)	2 (10)	1 (6,7)	4 (11,8)
IDH2 (%)	0 (0)	2 (10)	0 (0)	1 (6,7)	2 (5,9)
ASXL1 (%)	1 (6,7)	3 (15)	2 (10)	3 (20)	4 (11,8)
TET2 (%)	3 (20)	5 (25)	4 (20)	8 (53,3)	13 (38,2)

4.1.1. JAK2V617F

A mutação *JAK2V617F* é uma mutação com ganho de função de tirosina-quinase resultado de uma troca de guanina para timina no nucleotídeo 1849 com a substituição de uma valina para uma fenilalanina no códon 617 e essa alteração pode ser observada através da técnica PCR-RFLP em gel de agarose a 2% pela presença de um amplicon de 360pb na PCR (por todas as amostras) e pela possível presença de 3 situações após a digestão com BSAXI: presença de mutação em toda população de células, indentificadas pelo fragmento de 360pb já que não há a clivagem no sítio de restrição pela enzima por causa da troca de guanina para timina; a forma selvagem ou não mutada que apresenta somente o fragmento de 180pb, já que houve a clivagem do DNA no sítio de restrição pela enzima; ou duas populações celulares onde se nota um fragmento de 360pb e um de 180pb, com células de perfil selvagem e células de perfil mutado, como se observa na figura abaixo.

Figura 10: Visualização da eletroforese dos produtos de PCR-RFLP para mutação *JAK2V617F*. A: PCR com a presença de fragmento de 360pb para todas as amostras. B: Visualização dos mesmos produtos após a digestão com a enzima BSAXI. 2P: duas populações; SEL: selvagem e MUT: com a mutação V617F em *JAK2*.

Sendo assim, pode-se verificar a presença da mutação *JAK2V617F* em 80% dos pacientes com PV (12/15), em 35% dos pacientes com MFP (7/20) e em 55% dos pacientes com TE (11/20). Não foram encontrados casos positivos para essa mutação nos pacientes com outros diagnósticos, incluídos em dois grupos: leucemias/SMD e suspeitas de NMP.

4.1.2. *JAK2* exon 12

As mutações no exon 12 de *JAK2* afetam os resíduos de aminoácidos F537-E543 que se localizam em uma região altamente conservada próxima ao domínio JH2 da molécula de *JAK2* o que resulta em ativação constitutiva da via

JAK-STAT, sendo que essas alterações podem ser observadas através da técnica de sequenciamento direto.

Sendo assim, pode-se verificar a presença de mutação no exon 12 de *JAK2* em 6,7% dos pacientes com PV (1/15) apenas, não sendo identificada em nenhuma outra neoplasia. A mutação encontrada foi a K539L, que é a troca de adenina por timina no códon 539, o que leva a troca do aminoácido lisina por leucina, como pode ser verificado na figura abaixo.

Figura 11: Sequenciamento mostrando a mutação K539L de *JAK2*.

4.1.3. *JAK2*Y931C

A mutação *JAK2*Y931C é uma mutação onde há a troca de uma arginina por uma guanina no códon 931, o que acarreta na troca do aminoácido tirosina por cisteína o que permite resistência aos inibidores de JAK como o INCB018424 e CMP6 e esta pode ser avaliada através da técnica de sequenciamento direto, como pode ser observado na figura abaixo.

Figura 12: Sequenciamento mostrando a mutação Y931C de *JAK2*.

Desta forma, pode-se observar a mutação de *JAK2*Y931C em 6,7% dos pacientes com PV (1/15), em 5% dos pacientes com MFP (1/20) e 10% dos pacientes com TE (2/20), não sendo encontrada nos outros grupos de estudo.

4.1.4. *MPL*

O *MPL* é um receptor de trombopoetina que leva a ativação de uma série de cascatas de sinalização relacionadas com proliferação e diferenciação celular. As substituições em W515 são as mutações que afetam o exon 10 de *MPL*, o que acarreta na substituição de um triptofano por uma leucina no códon 515, com ganho de função.

As mutações no gene de *MPL* foram avaliadas por sequenciamento direto, porém não foi encontrada nenhuma mutação em nenhum dos pacientes avaliados neste estudo.

4.1.5. *CALR*

O gene *CALR* é o gene que codifica a proteína calreticulina, responsável pela regulação de Ca^{2+} no retículo endoplasmático. Todas as mutações no gene *CALR* são encontradas no exon 9 e levam a um frameshift, sendo que as mais encontradas são a deleção de 52pb (tipo 1) e inserção de 5pb (tipo 2).

As mutações no gene *CALR* foram observadas pela técnica de análise de fragmentos, onde há a presença de um pico de 262pb que é a população de células selvagem e um outro pico de 210pb no caso da deleção de 52pb ou pico de 267pb no caso da inserção de 5pb, como pode ser observado na figura abaixo.

Figura 13: Eletroferograma da análise de fragmentos do gene *CALR*. A: mutação do tipo 1 (deleção de 52pb); B: mutação do tipo 2 (inserção de 5pb).

No nosso caso, mutações no gene da *CALR* foram identificadas em 25% dos pacientes com MFP (5/20) e em 15% dos pacientes com TE (3/20), não sendo encontradas em nenhum outro grupo de pacientes.

Dentre os pacientes com MFP, das 5 mutações encontradas, 2 são do tipo 1 (deleção de 52pb), uma do tipo 2 (inserção de 5pb) além de uma deleção de 5pb e uma deleção de 20pb que são menos comuns.

Já dentre os pacientes com TE, das 3 mutações encontradas, 2 são do tipo 1 (deleção de 52pb) e uma do tipo 2 (inserção de 5pb).

4.1.6. *IDH1/IDH2*

Isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1/2*) são enzimas dependentes de NADP⁺, que participam do ciclo do ácido cítrico catalisando a conversão de isocitrato para α -cetoglutarato. As mutações em *IDH1* afetam o resíduo de arginina na posição 132 do exon 4, e seu análogo em *IDH2*-R172, indicando ganho de função. Mutações na posição R140 de *IDH2* também foram reportadas.

A análise de mutações em *IDH1* e *IDH2* foi feita por sequenciamento direto onde pode-se identificar em relação a *IDH1* mutações em 10% (2/20) dos pacientes com MFP, 10% (2/20) de pacientes positivos com TE, 6,7% (1/15) de casos positivos no grupo de pacientes com leucemias ou SMD, sendo este com SMD e 11,8% (4/34) de casos positivos no grupo de pacientes com suspeita de NMP. Já em relação ao *IDH2*, tem-se 10% (2/20) de casos positivos nos pacientes com TE, 6,7% (1/15) de positividade no grupo de leucemias e SMD,

sendo este com SMD e 5,9% (2/34) de casos positivos para mutações em *IDH2* no grupo de pacientes com suspeita de NMP.

Todas as mutações encontradas são heterozigotas e alguns exemplos das mutações encontradas em *IDH1* e *IDH2* encontram-se na figura abaixo.

Figura 14: Sequenciamento mostrando mutações encontradas em *IDH1* e *IDH2*. A: Mutação V71I de *IDH1*; B: mutação R132H de *IDH1*; C: Mutação R140Q de *IDH2*.

4.1.7. ASXL1

ASXL1 codifica a proteína nuclear *ASXL1*, que pode agir tanto como ativadora quanto repressora da transcrição através de uma série de mecanismos, principalmente envolvendo modificações de histonas. As mutações em *ASXL1* foram observadas através da técnica de sequenciamento direto e são todas heterozigotas. A figura abaixo mostra algumas das mutações encontradas nos pacientes do estudo.

Figura 15: Sequenciamento mostrando algumas das mutações encontradas no gene *ASXL1*. A: mutação R647Q; B: mutação I633V.

Sendo assim, pode-se verificar a presença de 6,7% (1/15) de casos positivos pra mutações em *ASXL1* nos pacientes com PV, 10% (2/20) de casos positivos nos pacientes com MFP, 15% (3/20) de positividade em TE, além de 20% (3/15) de casos positivos no grupo de pacientes com leucemias/SMD, sendo um com LMC e 2 com SMD e 11,8% (4/34) de casos positivos no grupo de pacientes com suspeita de NMP.

4.1.8. *TET2*

As proteínas TET (*TET1*, 2 e 3) são enzimas que catalisam a conversão de citosinas 5-metiladas em citosinas 5-hidroximetiladas (5HMC) e requerem Fe(II) e α -cetoglutarato como cofatores. As mutações em *TET2* acontecem principalmente nos exons 3 e 11, que foram os analisados neste estudo por sequenciamento direto. Alguns exemplos de mutações encontradas no gene *TET2* estão na figura abaixo.

com MFP, 25% (5/20) de casos positivos nos pacientes com TE, além de 53,3% (8/15) de casos positivos no grupo de pacientes com leucemias/SMD, sendo 4 com SMD, 2 com LMC, um com LMA e um com LMMC e 38,2% (13/34) de casos positivos para mutações em *TET2* no grupo de pacientes com suspeita de NMP.

4.2. Coocorrência de mutações

Todos os pacientes do estudo foram avaliados quanto à presença de mais de uma mutação de forma concomitante. O gráfico 1 abaixo, representa a frequência relativa e coocorrência de pares de mutações em pacientes com NMP.

O comprimento do arco corresponde à frequência de mutações no primeiro gene e a largura da fita corresponde à porcentagem de pacientes que também tinham uma mutação no segundo gene. Os arcos que se ligam no mesmo gene indicam as frequências da primeira mutação e as fitas que se ligam nas duas mostram quantos pacientes tem as duas mutações.

Gráfico 1: Coocorrência de mutações em pacientes com NMP.

Desta forma, como pode ser observado no gráfico acima, o único paciente com mutação no gene *JAK2* exon 12 não apresentou nenhuma outra mutação concomitante. Além disso, como não foi encontrada nenhuma mutação no gene *MPL* este não se encontra no gráfico.

4.2.1. *JAK2V617F*

Dentre os pacientes com mutações em *JAK2V617F* e outras mutações, 3 apresentavam mutações em *JAK2Y931C*, sendo que destes, um foi diagnosticado com PV, um com TE e um com MFP. Dos 2 pacientes com *JAK2V617F* e mutações em *IDH1*, um foi diagnosticado com TE e outro com MFP. Já em relação ao *IDH2*, os 2 pacientes que apresentaram ambas as mutações foram diagnosticados com TE. Quando se avalia mutações em *JAK2V617* e *ASXL1*, tem-se 4 pacientes, sendo que 2 destes apresentam TE, um PV e um MFP. Pode-se observar ainda a presença de 7 pacientes com mutações em *JAK2V617F* e *TET2*, sendo que destes, 2 apresentam PV, 3 apresentam TE e 2 foram diagnosticados com MFP.

4.2.2. *JAK2Y931C*

Dos 4 pacientes encontrados com mutações em *JAK2Y931C*, um além da mutação em *JAK2V617F*, apresenta também mutação em *IDH2* e *TET2* de forma concomitante e foi diagnosticado com TE. Já o paciente diagnosticado com MFP, apresenta além das mutações em *JAK2V617F* e *JAK2Y931C*, mutações no gene *TET2*. Além disso, um paciente com TE apresenta mutações em *JAK2Y931C* e *TET2* e o paciente com PV apresenta apenas a concomitância com mutações em *JAK2V617F*.

4.2.3. *CALR*

Dos 8 pacientes com mutações em *CALR*, apenas 2 apresentam também mutações em *TET2*, sendo que estes pacientes foram diagnosticados com TE e MFP. Nenhuma outra coocorrência foi encontrada com relação ao gene *CALR*.

4.2.4. *IDH1*

Apenas 9 pacientes apresentam mutações em *IDH1*, sendo que 2 deles apresentam também mutações em *TET2* e foram encontrados em pacientes no grupo de suspeitas de NMP. Além disso, 2 pacientes também apresentam mutações em *IDH1* e *ASXL1*, sendo que um deles é paciente do grupo de leucemias/SMD, sendo este com SMD e um foi diagnosticado com MFP. Dos 2 pacientes com *JAK2V617F* e mutações em *IDH1*, um foi diagnosticado com TE e outro com MFP.

4.2.5. *IDH2*

Dos 5 pacientes com mutações em *IDH2*, 2 apresentam mutações em *JAK2V617F* e foram diagnosticados com TE, sendo que um deles apresenta mutações em *ASXL1* de forma concomitante e outro com mutações em *TET2* de

forma concomitante. Além disso, 2 pacientes diagnosticados no grupo de leucemias/SMD, sendo este com SMD e no grupo de suspeitas de NMP, apresentam mutações em *IDH2* e *TET2*.

4.2.6. *ASXL1*

Dos 13 pacientes com mutações em *ASXL1*, 4 apresentam mutações em *JAK2V617F*, sendo diagnosticados um com PV, um MFP e 2 com TE. O paciente com MFP apresenta também mutação em *TET2* de forma concomitante e um dos pacientes com TE apresenta também mutações em *IDH2*. Além disso, 2 pacientes diagnosticados um com MFP e um no grupo de leucemias/SMD, sendo este com SMD, apresentam mutações em *IDH1* e *ASXL1* de forma concomitante. Tem-se ainda 2 pacientes que apresentam mutações em *ASXL1* e *TET2*, sendo que estes estão no grupo de suspeitas de NMP.

4.2.7. *TET2*

Dos 33 pacientes com mutações em *TET2*, 7 apresentam mutações em *JAK2V617F* também, sendo 2 com PV, 3 com TE e 2 com MFP. Destes, um com TE e um com MFP, apresentam ainda mutações em *JAK2Y931C* e *TET2* e um destes ainda apresenta mutações em *IDH2* de forma concomitante.

4.3. Correlação entre as características clínicas e as mutações encontradas.

Foi realizada a análise para avaliação se a presença de mutações acarreta em alterações clínicas nos pacientes com a mesma doença.

4.3.1. PV

No caso da PV, os pacientes que apresentam mutações em *JAK2V617F* apresentam valores aumentados de plaquetas (mediana de $5,41 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas) em relação aos pacientes sem a mutação (mediana de $2,06 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas), com diferença estatística ($p=0,031$). Além disso, os pacientes que apresentam mutações em *TET2* apresentam, opostamente aos com mutações em *JAK2*, menores valores de plaquetas (mediana de $1,75 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas) em relação aos pacientes sem mutações no gene *TET2* (mediana de $5,41 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas), com diferença estatística ($p=0,048$). Esses resultados podem ser observados na figura 17 abaixo.

Figura 17: Correlações entre as mutações *JAK2V617* e *TET2* com as características hematológicas dos pacientes com PV.

4.3.2. TE

Não houve nenhuma diferença estatística entre presença e ausência das mutações nos genes estudados em relação as características clínicas e hematológicas dos pacientes.

4.3.3. MFP

No caso da MFP, os pacientes que apresentam mutações em *JAK2V617F* apresentam valores maiores de leucócitos (mediana de $1,09 \times 10^4/\text{mm}^3$ leucócitos) do que os pacientes que não apresentam a mutação (mediana de $6,99 \times 10^3/\text{mm}^3$ leucócitos) com diferença estatística ($p=0,046$). Além disso, os pacientes que apresentam mutações no gene *ASXL1* apresentam valores menores de hemácias (mediana de $2,43 \times 10^6/\text{mm}^3$ hemácias) em relação aos pacientes que não apresentam mutação (mediana de $3,71 \times 10^6/\text{mm}^3$ hemácias) com diferença estatística ($p=0,042$).

Esses resultados podem ser observados na figura 18 abaixo.

Figura 18: Correlações entre as mutações *JAK2V617* e *ASXL1* com as características hematológicas dos pacientes com MFP.

4.3.4. Leucemias/SMD e Suspeitas de NMP

Não houve nenhuma diferença estatística entre presença e ausência das mutações nos genes estudados em relação as características clínicas e hematológicas dos pacientes.

5. DISCUSSÃO

As neoplasias mieloproliferativas, que incluem a PV, TE, MFP e LMC além de uma série de subtipos como a leucemia neutrofílica crônica, síndrome hipereosinofílica e leucemia eosinofílica crônica, compartilham uma série de fatores como: a origem em uma célula progenitora hematopoiética multipotente, dominância clonal de células progenitoras malignas em relação às células normais, produção aumentada de um ou mais elementos do sangue, hematopoiese extramedular e transformação em leucemia aguda nas mais variadas proporções, porém, a distinção entre essas e em relação a outras condições semelhantes pode ser muito difícil, já que apenas a LMC apresenta um marcador diagnóstico específico, o cromossomo Philadelphia.^{3,5}

Por este fato, a Organização Mundial de Saúde em 2008 acrescentou aos critérios diagnósticos dessas doenças a presença de mutações no gene *JAK2* e *MPL*.³ A presença de mutação em *JAK2* foi descrita inicialmente em 2005^{67,68}, onde há a troca de uma guanina por uma timina no códon 617, resultando na substituição da valina por uma fenilalanina. A mutação *JAK2V617F* acarreta na ativação constitutiva da via JAK-STAT levando a proliferação celular descontrolada e independente de estímulos externos provenientes de citocinas.¹⁶ Segundo os autores, a mutação é encontrada em 81-95% dos pacientes com PV e 40-60% dos pacientes com TE ou MFP^{4,67,68,69}, sendo que no presente trabalho pode-se verificar a presença da mutação *JAK2V617F* em 80% dos pacientes com PV (12/15), em 35% dos pacientes com MFP (7/20) e em 55% dos pacientes com TE (11/20). Não foram encontrados casos positivos para essa mutação nos pacientes com outros diagnósticos, incluídos em dois grupos: leucemias/SMD e suspeitas de NMP. Sendo assim, os valores de frequência encontrados estão de acordo com a literatura.

Além da mutação *JAK2V617F* que ocorre com certa frequência, outras duas alterações genéticas foram reportadas, como a presença de mutações no exon 12 de *JAK2* que ocorre em 3% dos pacientes com PV, sendo que 30%

dessas mutações é do tipo N542-N543del^{26,27,69} e a outra alteração é a mutação *JAK2Y931C*, que confere resistência aos inibidores de *JAK1* e *JAK2* como o ruxolitinibe utilizado no tratamento da MFP²⁸. As mutações no exon 12 de *JAK2* só acontecem nos pacientes com PV negativas para a mutação *JAK2V617F* e a frequência encontrada foi de 6,7% (1/15) sendo que a mutação encontrada foi a K539L, que é a troca de adenina por timina no códon 539, o que leva a troca do aminoácido lisina por leucina. A mutação *JAK2Y931C* é uma mutação onde há a troca de uma adenina por uma guanina no códon 931, o que acarreta na troca do aminoácido tirosina por cisteína ocasionando a resistência aos inibidores de *JAK* como o INCB018424 e CMP6.^{28,70} Não há descrição da frequência desta alteração genética em pacientes com NMP em nenhum dos estudos em que há avaliação desta e outras mutações de resistência como G935R e E864K.^{28,70} No presente estudo foi encontrado em 6,7% dos pacientes com PV (1/15), em 5% dos pacientes com MFP (1/20) e 10% dos pacientes com TE (2/20), não sendo encontrada nos outros grupos de estudo.

Além da mutação *JAK2V617F*, mutações no gene *MPL*, que codifica o receptor de trombopoetina, ocorrem em aproximadamente 6-8% das MFP e em 3-4% das TE, assim como na síndrome mielodisplásica do tipo RARS-t (raramente – menos de 2% dos casos) e na leucemia mielóide aguda (25% dos casos de leucemia megacarioblástica aguda com mielofibrose, que é um subtipo de LMA). Estas mutações ocorrem mais precisamente no exon 10 e resultam na ativação da via *JAK-STAT* independente da ligação da trombopoetina levando a proliferação e diferenciação dos megacariócitos e das plaquetas.^{31,32,69} O fato de não terem sido identificados casos com esta mutação pode ser justificado pelo baixo número de pacientes com TE e MFP e também pela baixa frequência desta mutação nos relatos na literatura. Um estudo interessante, mostra ainda que o fato de perder o receptor de trombopoetina (*MPL*) aumenta significativamente o desenvolvimento das NMP positivas para *JAK2V617F*, enquanto a ausência de trombopoetina apenas não afeta de forma significativa o fenótipo da doença, o que mostra a importância deste receptor para o desenvolvimento das NMPs. Isso se deve ao fato de que não há somente a trombopoetina como ligante do

receptor de *MPL*, e na ausência desta, o receptor pode funcionar com outros ligantes, já na perda do receptor, o dano é irreparável.⁷¹

Recentemente, dois grupos distintos reportaram mutações no gene da calreticulina (*CALR*) em pacientes com NMP que não apresentavam mutações em *JAK2* ou em *MPL*. Este gene *CALR* codifica a proteína de ligação de Ca^{2+} , calreticulina, que é a principal responsável pela retenção de cálcio no retículo endoplasmático, sendo o Ca^{2+} importante regulador do crescimento celular, proliferação, adesão, resposta imune, fagocitose, além de conseguir induzir a apoptose.³⁴ As mutações em *CALR* foram identificadas em colônias granulocíticas-macrofágicas, indicando que elas ocorrem em um progenitor multipotente capaz de gerar tanto progenitores mielóides quanto eritróides.^{39,40} Dentre as mutações no gene *CALR* as principais ocorrem no exon 9 e são classificadas como do tipo 1 e do tipo 2.^{39,40} Estas mutações ocorrem em 25% dos pacientes com TE ou MFP, sendo que as outras mutações descritas acontecem em frequências menores.^{39,40,69} No presente estudo, mutações no gene da *CALR* foram identificadas em 25% dos pacientes com MFP (5/20) e em 15% dos pacientes com TE (3/20), não sendo encontradas em nenhum outro grupo de pacientes estudados.

Estudos mostram que a frequência das mutações do tipo 1 e do tipo 2 são diferentes em relação à NMP, onde há uma menor frequência de mutações do tipo 2 em pacientes com MFP do que em pacientes com TE. As diferenças observadas na estrutura da proteína de calreticulina pode implicar em diferenças clínicas nesses pacientes, onde pacientes com TE que apresentam mutações do tipo 2 apresentam idade mais avançada ao diagnóstico, maior contagem de plaquetas e mais frequentemente precisam de terapêutica citorrredutora do que os pacientes com o tipo 1. As mutações do tipo 2 também apresentam pior prognóstico nos pacientes com MFP, indicando que possa existir uma relação com as inserções ou deleções que ocorrem no gene da *CALR*.^{40,72,73} No nosso caso, quando se avalia os pacientes com TE, os pacientes com a mutação do tipo 1 apresentam maior contagem de plaquetas (média de 1.237mil/mm³) e menor idade ao diagnóstico (média de 51,5 anos) em relação aos pacientes com o tipo 2 que apresentam menor quantidade de plaquetas (média de 674mil/mm³)

e maior idade ao diagnóstico (média de 72 anos). Essa diferença em relação à literatura pode ser devida a baixa quantidade de pacientes avaliados. Já em relação aos pacientes com MFP, os pacientes com mutação em *CALR* do tipo 1 apresentam menor contagem de plaquetas (média de 217mil/mm³) e menor idade ao diagnóstico (média de 43 anos) do que os pacientes com o tipo 2 que apresentam maior contagem de plaquetas (média de 712mil/mm³) e maior idade ao diagnóstico (média 65 anos).

Dentre os pacientes com MFP, das 5 mutações encontradas, 2 são do tipo 1 (deleção de 52pb), uma do tipo 2 (inserção de 5pb) além de uma deleção de 5pb e uma deleção de 20pb que são menos comuns. Já dentre os pacientes com TE, das 3 mutações encontradas, 2 são do tipo 1 (deleção de 52pb) e uma do tipo 2 (inserção de 5pb). Não foi encontrada diferença entre os grupos possivelmente pela baixa quantidade de pacientes avaliados.

Segundo a literatura, mutações nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR* são consideradas “driver mutations”, ou seja, mutações essenciais para que haja o desenvolvimento da NMP e são mutuamente exclusivas, como foi confirmado pelo presente estudo, onde nenhuma destas mutações apareceu de forma concomitante. Outra observação reportada neste estudo é que não foram identificadas nenhuma mutação dos genes mencionados acima nas amostras com diagnóstico diferente do que NMP. Os pacientes considerados triplamente negativos são os de menor sobrevida, seguidos pelos pacientes com mutações em *JAK2*, depois com *MPL* e por último os de maior sobrevida são os pacientes com mutações em *CALR* tanto para MFP quanto para TE, não havendo estudos que reportam achados semelhantes em pacientes com PV, isto devido pela quase totalidade destes pacientes apresentarem a mutação *JAK2*V617F.^{72,73,74,75} Como o presente estudo se baseia na utilização de amostras ao diagnóstico apenas, não foi possível realizar estudos de sobrevida, mas verifica-se diferenças clínicas entre esses pacientes e os com mutações em *JAK2* ou *CALR*.

Os pacientes com MFP, que não apresentam mutações nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR*, denominados triplamente negativos apresentam um menor número de leucócitos (5.600/mm³) ao diagnóstico quando comparado aos

pacientes com mutação em *CALR* ($12.700/\text{mm}^3$) ou a presença de *JAK2V617F* ($19.500/\text{mm}^3$).

Em TE, os pacientes triplamente negativos ou com mutações em *CALR* são mais jovens do que os pacientes com mutações em *JAK2*, além de serem semelhantes quanto a menores valores de hemoglobina e leucócitos e maiores valores de plaquetas que em relação aos com mutações em *JAK2*.⁷⁴ No presente estudo não foi observado nenhuma diferença nas variáveis idade e laboratoriais entre os pacientes com TE triplamente negativos, ou com mutações em *CALR* ou em *JAK2*. Além disso, complicações de coagulação são mais frequentes em pacientes com *JAK2* mutados do que com *CALR* mutados, já transformação mielofibrótica é mais frequente em pacientes com *CALR* mutados do que com mutações em *JAK2*.⁷² No caso da MFP, apesar da presença de mutações na *CALR* apresentarem maiores contagens de plaquetas, o risco de trombose desses pacientes é baixo, principalmente quando comparados com pacientes com mutações em *JAK2*. Ainda para pacientes com MFP, os com mutações em *CALR* são os com menor incidência cumulativa de anemia, trombocitopenia e leucocitose, seguidos pelos com mutações em *MPL*, depois em *JAK2* e os com maior incidência cumulativa nas três situações continua sendo os triplamente negativos, que o estudo compara com as mesmas características de pacientes com síndrome mielodisplásica.^{72,75}

No nosso estudo, pode-se observar no caso da PV, que os pacientes que apresentam mutações em *JAK2V617F* apresentam valores aumentados de plaquetas ($5,41 \times 10^5/\text{mm}^3$) em relação aos pacientes sem a mutação ($2,06 \times 10^5/\text{mm}^3$), com diferença estatística ($p=0,031$).

As mutações epigenéticas tem se mostrado muito importantes quanto ao prognóstico e sobrevida dos pacientes, principalmente quando acontecem de forma concomitante com outros genes considerados essenciais para o desenvolvimento da doença clonal, podendo, portanto, estar envolvidas com a progressão da NMP e relacionadas com à estratificação de risco desses pacientes.⁴¹ Neste trabalho foram avaliados os genes *IDH1/2*, *TET2* e *ASXL1*.

Mutações somáticas nos genes *IDH1* e *IDH2* ocorrem em regiões conservadas do gene, sendo que a mutação *IDH1R132* e a *IDH2R172* resultam em um ganho de função gênica inibindo *TET2* e assim resultando na redução da

hidroximetilação de 5-metil-citosina e demetilação.^{45,46,47,48} A frequência destas mutações é baixa, ocorrendo em 1% das TE, 2% nas PV e em 4-22% nas MFP.⁶⁹ Outro estudo mostra a presença de mutações em *IDH1* ou *IDH2* em 8,8% dos pacientes com NMP ou SMD.⁷⁶ No nosso estudo, pode-se identificar em relação a *IDH1* mutações em 10% dos pacientes com MFP (2/20), 10% de pacientes positivos com TE (2/20), 6,7% de casos positivos no grupo de pacientes com leucemias ou SMD (1/15) e 11,8% de casos positivos no grupo de pacientes com suspeita de NMP (4/34). Já em relação ao *IDH2*, tem-se 10% de casos positivos nos pacientes com TE (2/20), 6,7% de positividade no grupo de leucemias e SMD (1/15) e 5,9% de casos positivos para mutações em *IDH2* no grupo de pacientes com suspeita de NMP (2/34). As mutações em *IDH1* e *IDH2* são mutuamente exclusivas, o que foi confirmado neste estudo, já que não foi encontrado nenhum paciente com as duas mutações de forma concomitante.^{44,45}

Estudos recentes mostram que *ASXL1* interage com os componentes do complexo polycomb PCR2, conhecidos como EZH2 e SUZ12, duas proteínas envolvidas na deposição e repressão de H3K27me3 inibindo a transcrição. As alterações genéticas no gene *ASXL1*, responsável pela ativação ou repressão da transcrição gênica, são do tipo *nonsense* ou *frameshift* resultando na perda da região C-terminal da proteína.^{56,57} A frequência nas NMP é mais alta, ocorrendo em 32% dos pacientes com MFP, 36% das MFP secundárias à PV, 50% dos pacientes com MFP secundária a TE e raramente encontradas em pacientes com TE e PV.^{58,59,60} Outro estudo mostra a frequência de 7% nos pacientes com PV, 4% dos pacientes com TE e 20% dos pacientes com MFP.⁶⁹ Sendo assim, pode-se verificar neste estudo a presença de 6,7% de casos positivos pra mutações em *ASXL1* nos pacientes com PV (1/15), 10% de casos positivos nos pacientes com MFP (2/20), 15% de positividade em TE (3/20), além de 20% de casos positivos no grupo de pacientes com leucemias/SMD (3/15) e 11,8% de casos positivos no grupo de pacientes com suspeita de NMP (4/34).

Além disso, os pacientes com MFP que apresentam mutações no gene *ASXL1* apresentam valores menores de hemácias (mediana de $2,43 \times 10^6/\text{mm}^3$ hemácias) em relação aos pacientes que não apresentam mutação (mediana de $3,71 \times 10^6/\text{mm}^3$ hemácias) com diferença estatística ($p=0,042$).

Como *TET2* exerce um papel chave na demetilação do DNA, sua deficiência reduz os níveis de citosinas hidroximetiladas no DNA genômico, o que impede a diferenciação de stem cells hematopoiéticas, e aumenta a capacidade de repopulação em experimentos de transplantes competitivos.^{41,51,54} As mutações em *TET2* são encontradas em 4% dos pacientes com trombocitemia essencial, 16% dos pacientes com policitemia vera e 17% dos pacientes com mielofibrose primária. Um estudo recente mostrou, entretanto, que mutações somáticas em *TET2* estão presentes em 5,6% de pacientes com hematopoiese clonal, mas que não apresentam malignidade hematológica.^{55,69} Sendo assim, pode-se identificar neste estudo, a presença de 20% de casos positivos nos pacientes com PV (3/15), 20% de casos positivos nos pacientes com MFP (4/20), 25% de casos positivos nos pacientes com TE (5/20), além de 53,3% de casos positivos no grupo de pacientes com leucemias/SMD (8/15) e 38,2% de casos positivos para mutações em *TET2* no grupo de pacientes com suspeita de NMP (13/34).

Além disso, os pacientes com PV que apresentam mutações em *TET2* apresentam, opostamente aos com mutações em *JAK2*, menores valores de plaquetas (mediana de $1,75 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas) em relação aos pacientes sem mutações no gene *TET2* (mediana de $5,41 \times 10^5/\text{mm}^3$ plaquetas), com diferença estatística ($p=0,048$).

Estudos mostram ainda que a presença das mutações epigenéticas de forma concomitante com as “driver mutations” pode ser benéfica ou prejudicial dependendo do período em que aconteça ou dos genes atingidos. Um estudo mostra que mutações em *TET2* em pacientes com *JAK2V617F* resulta em crescimento celular anormal e eficiente iniciação de NMP em comparação com células normais, indicando que a perda de *TET2* pode induzir hematopoiese clonal principalmente em nível de progenitores celulares. Por causa disso, pacientes com ambas as mutações apresentam um fenótipo mais severo que os pacientes que apresentam apenas mutações em *JAK2*. Além disso, este grupo mostra que a mutação em *TET2* pode acontecer antes ou depois da mutação em *JAK2*, onde quando acontece anteriormente a mutação em *JAK2*, acaba sendo responsável pela iniciação da NMP por estar relacionado com a

hematopoiese clonal. Já quando acontece após a mutação em *JAK2* estaria relacionado com aceleração do grau de malignidade e progressão da NMP.⁷⁷

Outro estudo mostra a relação entre pacientes que apresentam de forma concomitante mutações em *CALR* e *ASXL1*. Neste caso, os pacientes que apresentam apenas mutações em *ASXL1* apresentam menor sobrevida que os pacientes com ambas as mutações, porém com sobrevida inferior aos pacientes que apresentam apenas mutações em *CALR*, indicando que as mutações em *ASXL1* favorecem um pior prognóstico para os pacientes com NMP, e que quando as duas mutações acontecem de forma concomitante a mutação em *CALR* acaba reduzindo a influência negativa que as mutações em *ASXL1* fornecem.⁷⁸

6. CONCLUSÃO

O presente estudo pode caracterizar um perfil genético dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas cromossomo Filadélfia negativo, onde a identificação das mutações nos genes *JAK2* e *CALR* são características dessas neoplasias e a identificação de anomalias genéticas no gene *CALR* permite ainda classificar as NMP quanto ao prognóstico.

Além disso, foi possível observar que algumas mutações epigenéticas, como no caso de *ASXL1* mostrou estar relacionada a valores inferiores no número de glóbulos vermelhos em pacientes com Mielofibrose primária. E alterações genéticas no gene *TET2* em pacientes com Policitemia vera estavam relacionadas com valores inferiores no número de plaquetas do que àqueles sem mutação neste mesmo gene.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tefferi A.; Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding and treatment strategies. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(5): 573-82.
2. Chauffaille, MLLF. Myeloproliferative neoplasms: a review of diagnostic criteria and clinical aspects. *Rev. Bras. Hemato. e Hemote.* 2010; 32(4): 308-16
3. Vardiman JW., Thiele J., Arber DA., Brunning RD.; Borowitz MJ., Porwit A., et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009; 114: 937-51.
4. Vakil E., Tefferi A., BCR-ABL1-Negative Myeloproliferative Neoplasms: A Review of Molecular Biology, Diagnosis, and Treatment, *Clin. Lymphoma, Myeloma & leukemia.* 2011; 11: S37-45.
5. Jerry L., Spivak MD. Diagnostic Evaluation of the Chronic Myeloproliferative Disorders. *IMAJ.* 2002; 4:1028-31.
6. Bittencourt RI., Vassallo J., Chaffaille, L., Xavier SG., Pagnano KB., Nascimento AC. et al. Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2012; 34(2): 140-9.
7. Landolfi R., Gennaro, L. Prevention of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocytemia. *Haematologica.* 2008; 93(3): 331-5.
8. Spivak, JL., Considine, M., Williams, DM., Talbot CC., Rogers O. et al. Two Clinical Phenotypes in Polycythemia Vera. *N Engl J Med.* 2014;371: 808-17.

9. Tefferi A., Thiele J., Orazi A., Kvasnicka HM., Barbui T., Hanson CA. et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytemia, and primary myelofibrosis: recommendations from and ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007; 110(4):1092-7.

10. Johansson P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocytemia. *Semin. Thromb. Hematost.* 2006; 32(3): 171-3.

11. Giordon F., Bonicelli G., Schaeffer C., Mounier M., Carillo S., Lafon I. et al. Significant increase in the apparent incidence of essential thrombocytemia related to the new WHO diagnostic criteria: a population-based study. *Haematologica*. 2009; 94(6): 865-9.

12. Vannucchi AM. Management of myelofibroses. *Amer. Socie. Hematol.* 2011; 222-30.

13. Tefferi A., Vaidya R., Caramazza D., Finke C., Lasho T., Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(10): 1356-63.

14. Cervantes F., Dupriez B., Pereira A., Passamonti F., Reilly JT., Morra E. et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009; 113(13): 2895-901.

15. Passamonti F., Cervantes F., Vannucchi AM., Morra E., Rumi E., Cazzola M. et al. Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. *Blood*. 2010; 116(15): 2857-8.

16. Schindler C., Levy DE., Decker T. JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. *The J. of Biol. Chemistry*. 2007; 282(28):20059–63.
17. Rawlings JS., Rosler KM., Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J. of Cell Science*. 2004; 117: 1281-3.
18. Morgan KJ., Gilliland DG. A role for *JAK2* mutations in myeloproliferative diseases. *Annu. Rev. Med*. 2008; 59: 213-22.
19. Lee TS., Ma W., Zhang X., Kantarjian H., Albitar M. Structural effects of clinically observed mutations in *JAK2* exon 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC Struc. Biolol*. 2009; 9: 58-72.
20. Funakoshi-Tago M., Pelletier S., Matsuda T., Parganas E., Ihle JN. Receptor specific downregulation of cytokine signaling by autophosphorylation in the FERM domain of *JAK2*. *EMBO J*. 2006; 25(20): 4763-72.
21. Chim CS., Fung TK., Cheung WC., Liang R., Kwong YL. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the JAK/STAT pathway. *Blood*. 2004; 103(12): 4630-5.
22. Shuai K., Liu B. Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system. *Nature Rev. Imuno*. 2003; 3(11): 900-11.
23. Scott LM., Tong W., Levine RL., Scott MA., Beer PA., Stratton MR. et al. *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med*. 2007; 356(5):459-68.
24. Ma L., Clayton JR, Walgren RA, Zhao B, Evans RJ, Smith MC. Discovery and characterization of LY2784544, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor of *JAK2V617F*. *Blood Cancer Journal*. 2013; 109(3): 1-11.

25. Ma W., Kantarjan H., Zhang X., Yeh CH., Zhang ZJ., Verstovsek S. et al. Mutation profile of *JAK2* transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J. Mol. Diag.* 2009; 11(1): 49-53.

26. Butcher CM., Hahn U., To LB., Gecz J., Wilkins EJ., Scott HS. et al. Two novel *JAK2* exon 12 mutations in *JAK2V617F*-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia*. 2008; 22: 870–3.

27. Scott LM. The *JAK2* exon 12 mutations: A comprehensive review. *Am. J. Hematol.* 2011; 86(8) :668– 76.

28. Hornakov T., Springuel L., Devreux J., Dusa A., Constantinescu SN., Knoops L. et al. Oncogenic *JAK1* and *JAK2*-activating mutations resistant to ATP-competitive inhibitors. *Haematologica*. 2011; 96(6): 845-53.

29. Jeong EG., Kim MS., Nam HK., Min CK., Lee S., Chung YJ. et al. Somatic Mutations of *JAK1* and *JAK3* in Acute Leukemias and Solid Cancers. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(12): 3716-21.

30. Santos FP., Verstovsek S. *JAK2* Inhibitors: Are they the solution? *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2011; 11(S1): S28-36.

31. Xin H., Zhigang C., Yangyan J., Xi Q., Xiaoying Z. Different mutations of the human *c-MPL* gene indicate distinct haematopoietic diseases. *J. Hemat. Oncol.* 2013; 6(1): 11-9.

32. Staerk J., Lacout C., Sato T., Smith SO., Vainchenker W. Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006; 107(5): 1864-71.

33. Chaligné R., Tonetti C., Besancenot R., Roy L., Marty C., Mossuz P. et al. New mutations of *MPL* in primitive myelofibrosis: only the *MPL* W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*. 2008; 22(8):1557-66.

34. Arnaudeau S., Frieden M., Nakamura K., Castelbou C., Michalak M., Demareux N. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Biol. Chem*. 2002; 277(48): 46696-705.

35. Michalak M., Groenendyk J., Szabo E., Gold LI., Opas M. Calreticulin, a multiprocess calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J*. 2009; 417(3): 651-66.

36. Del Cid N., Jeffery E., Rizvi SM., Stamper E., Peters LR., Brown WC. et al. Modes of calreticulin recruitment to the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *J. Biol. Chem*. 2010; 285(7): 4520-35.

37. Castañeda-Platlán CM., Razo-Paredes R., Carrisoza-Gaytán R., González-Mariscal L., Robles-Flores M. Protein kinase C is involved in the regulation of several calreticulin posttranslational modifications. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2010; 42(1): 120–31.

38. Mendlovic F., Conconi M. Calreticulin: a Multifaceted Protein. *Nature Education*. 2010; 4(1): 1.

39. Klampf T., Gisslinger H., Harutyunyan AS., Nivarthi H., Rumi E., Milosevic J. et al. Somatic mutations of Calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New Engl. J. Medic*. 2013; 369 (25): 2379-90.

40. Nangalia J., Massie CE., Baxter EJ., Nice FL., Gundle G., Wedgwood DC., et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *New Engl. J. Medic*. 2013; 369:2391-405.

41. Milosevic JD., Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int. J. Hematol.* 2013; 97: 183-97.
42. Campregher PV., Santos FPS., Perini GF., Hamerschlak N. Molecular biology of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2012; 34(2): 150-5.
43. Reitman ZJ., Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(13): 932–41.
44. Tefferi A., Lasho TL., Abdel-Wahab O., Guglielmelli P., Patel J., Caramazza D. et al. *IDH1* and *IDH2* mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia.* 2010; 24(7): 1302-9.
45. Pardani A., Lasho TL., Finke CM., Mai M., McClure RF., Tefferi A. *IDH1* and *IDH2* mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2010; 24(6): 1146-51.
46. Mckenney AS., Levine RL. Isocitrate dehydrogenase mutations in leukemia. *J. Clin. Inv.* 2013; 123(9): 3672- 7.
47. Ward PS., Patel J., Wise DR., Abdel-Wahab O., Bennet BD., Collier HA. et al. The common feature of leukemia-associated *IDH1* and *IDH2* mutations in a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell.* 2010; 17(3): 215-6.
48. Gross S., Cairns RA., Minden MD., Driggers EM., Bittinger MA., Jang HG. et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J. Exp. Med.* 2010; 207(4): 677-80.

49. Rohle D., Popovici-Muller J., Palaskas N., Turcan S., Grommes C., Campos C. et al. An inhibitor of mutant *IDH1* delays growth and promotes differentiation of gliomas cells. *Science*. 2013; 340(6132): 626-30.
50. Wang F., Travins J., DeLaBarre B., Penard-Lacronique V., Schalm S., Hansen E. et al. Targeted inhibition of mutant *IDH2* in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*. 2013; 340(6132): 622-6.
51. Abdel-Wahab O., Mullally A., Hedvat C., Garcia-Manero G., Patel J., Wadleigh M. et al. Genetic characterization of *TET1*, *TET2*, and *TET3* alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009; 114(1): 144-7.
52. Ko M., Huang Y., Jankowska AM., Pape UJ., Tahiliani M., Bandujwala HS. et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant *TET2*. *Nature*. 2010; 468(7325): 839-43.
53. Bacher U., Haferlach C., Schnittger S., Kohlmann A., Kern W., Haferlach T. Mutations of the *TET2* and *CBL* genes: novel molecular markers in myeloid malignancies. *Ann. Hematol.* 2010; 89(7): 643-52.
54. Cimmino L., Abdel-Wahab O., Levine RL. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell*. 2011; 9:193-204.
55. Tefferi A., Pardanani A., Lim KH., Abdel-Wahab O., Lasho TL., Patel J. *TET2* mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009; 23(5): 905-11.
56. Lee SW., Cho YS., Na JM., Park UH., Kang M., Kim EJ. et al. ASXL1 represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LSD1. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(1): 18-29.

57. Gelsi-Boyer V., Brecqueville M., Devilier R., Murati A., Mozziconacci MJ., Birnbaum D. Mutations in *ASXL1* are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J. Hematol. Oncol.* 2012; 5:12.
58. Stein BL., Williams DM., O'Keefe C., Rogers O., Ingersoll RG., Spivak JL. et al. Disruption of the *ASXL1* gene is frequent in primary, post-essential thrombocythosis or polycythemia vera and myelofibrosis, but not essential thrombocythosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematol.* 2011; 96(10): 1462-9.
59. Abdel-Wahab O., Pardanani A., Patel J., Wadleigh M., Lasho T., Heguy A. et al. Concomitant analysis of *EZH2* and *ASXL1* mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2010; 25(7): 1200-2.
60. Carbuccion A., Murati V., Truplin M., Brecqueville J., Adélaide J., Rey J. et al. Mutations of *ASXL1* gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2009; 23(11): 2183-6.
61. Steensma D P., Dewald G W., Lasho T L., Powell H L., McClure R F., Levine R L. et al. The *JAK2V617F* activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2005; 106 (4): 1207-9.
62. Rapado I., Grande S., Albizua E., Ayala R., Hernandez J A., Gallardo S., et al. High Resolution Melting Analysis for *JAK2* exon 14 and exon 12 mutations: A diagnostic tool for Myeloproliferative Neoplasms. *J. Molec. Diagn.* 2009; 11 (2): 155-61.
63. Pardanani A D., Levine R L., Lasho T., Pikman Y., Mesa R A., Wadleigh M. et al. *MPL515* mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood.* 2006; 108 (10): 3472-6.

64. Chotirat S., Thongnoppakhun W., Promsuwicha O., Boonthimat C., Auewarakul C U., Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (*IDH1* and *IDH2*) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. *J. Hemato. & Oncol.* 2012; 5 (5): 1-10.

65. Pratcorona M., Abbas S., Sanders M A., Koenders J E., Kavelaars F G., Erpelinck-Verschueren C A J., et al. Acquired mutations in *ASXL1* in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematol.* 2012; 97 (3): 388-92.

66. Fernandez-Mercado M., Yip B H., Pellagatti A., Davies C., Larrayoz M J., Kondo T. et al. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. *Plos One.* 2012; 7 (8): 1-7.

67. James C., Ugo V., Le Couedic JP., Staerk J., Delhommeau F., Lacout C et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005; 434(7037): 1144-8.

68. Kralovics R., Passamonti F., Buser AS., Teo SS., Tiedt R., Passweg JR., et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005; 352(17): 779-90.

69. Tefferi A., Pardani A. Myeloproliferative Neoplasms A Contemporary Review. *JAMA Onco.* 2015; 1(1): 97-105.

70. Weigert O., Lane AA., Bird L., Kopp N., Chapuy B., Bodegom D. et al. Genetic resistance to *JAK2* enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. *J. Exp. Med.* 2012; 209(2): 259-73.

71. Sangkhae V., Etheridge SL., Kaushansky K., Hitchcock IA. The thrombopoietin receptor, *MPL*, is critical for development of a *JAK2V617F*-induced myeloproliferative neoplasm. *Blood.* 2014; 124(26): 3956-63.

72. Andrikovics H., Krahling T., Balassa K., Halm G., Bors A., Koszarska M. et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*. 2014; 99(7): 1184-90.
73. Tefferi A., Lasho TL., Finke CM., Knudson RA., Ketterling R., Hanson CH. et al. *CALR* vs *JAK2* vs *MPL*-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014; 28: 1472-7.
74. Tefferi A., Wassie EA., Lasho TL., Finke C., Belachew AA., Ketterling RP. et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2014; 28(12): 2300-3.
75. Rumi E., Pietra D., Pascutto C., Guglielmelli P., Martinez-Trillos A., Casetti I. et al. Clinical effect of driver mutations of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014; 124(7): 1062-9.
76. Thol F., Weissinger EM., Krauter J., Wagner K., Damm F., Wichmann F. et al. *IDH1* mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica*. 2010; 95(10): 1668-74.
77. Kameda T., Shide K., Yamaji T., Kamiunten A., Sekine M., Taniguchi Y. et al. Loss of *TET2* has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. *Blood*. 2015; 125(2): 304-14.
78. Tefferi A., Guglielmelli P., Lasho TL., Rotunno G., Finke C., Mannarelli C. et al. *CALR* and *ASXL1* mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia*. 2014; 28: 1494-500.