UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

ALLINE DIDONE

**Estudo comparativo entre diferentes metodologias na detecção da
mutação *JAK2V617F* em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR-
ABL1* Negativo**

São Paulo
2015

ALLINE DIDONE

**Estudo comparativo entre diferentes metodologias na detecção da
mutação *JAK2V617F* em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR-
ABL1* 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

Didone, Aline

Estudo comparativo entre diferentes metodologias na detecção da mutação *JAK2V617F* em neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR-ABL 1* negativo / Aline Didone. -- 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.Janus Quinase 2.Reação em cadeia da polimerase/métodos 3.Mutação 4.Neoplasias hematológicas 5.Transtornos mieloproliferativos 6.Policitemia Vera 7.Mielofibrose primária 8.Trombocitemia essencial

Nome: Didone, Alline

Título: Estudo comparativo entre diferentes metodologias na detecção da mutação *JAK2V617F* em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR-ABL1* 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: _____

À minha mãe, Conceição pelo amor incondicional, apoio e fé no meu sucesso.

Ao meu pai Jesuino (*In memoriam*), que adoraria ter visto esse trabalho e se encheria de orgulho.

Ao meu noivo, Thiago por não me deixar desistir dos meus objetivos e por me mostrar um novo mundo, cheio de amor e esperança.

Primeiramente ao meu orientador, Professor Israel Bendit pela orientação, paciência e lições aprendidas.

A minha chefe, Luciana, pela colaboração durante todo o processo do meu trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Tumoral e Citogenética, pelo companheirismo e que de algum modo, me auxiliaram nesse trabalho.

À minha Irmã, Amanda e minha família, que sempre me incentivaram a crescer profissionalmente. Especialmente à minha tia Maria das Graças, que com toda prontidão dispôs seu tempo para corrigir rapidamente esse trabalho.

À minha nova família, Dona Márcia, Seu Kal, Monique, Fernando e Nilda, por me acolherem tão rapidamente e pelo grande apoio aos meus estudos, mesmo que durante os finais de semana em família.

Aos meus amigos da UNISA, Monyca, Tamires, Thiago e Yoná pela amizade e por sempre terem um tempinho livre para trocar conselhos e lições acadêmicas.

À minha família de coração, Bel, Samara e Ronaldo, que sem nunca duvidarem da minha capacidade e nunca pedirem nada em troca, em comunidade, ajudaram-me a superar meus medos.

A Equipe da secretaria da pós-graduação, Rose e Angélica, pelo auxílio em questões burocráticas do mestrado.

A todos que me ajudaram de alguma maneira na realização desse trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Neoplasias Mieloproliferativas Cromossoma Filadélfia Negativo.....	2
1.1.1. Policitemia Vera.....	2
1.1.2. Trombocitemia Essencial	3
1.1.3. Mielofibroses	4
1.2. Distúrbios Genéticos Envolvidos nas NMPs.....	4
1.2.1 Janus Kinase (<i>JAK</i>)	5
1.2.2. Mutação <i>JAK2V617F</i> do Gene <i>JAK2</i>	6
1.3. Diagnóstico das NMPs.....	8
1.3.1.PCR-RFLP (Polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição)10	
1.3.2. ARMS-PCR (Sistema de amplificação refratária de mutação)	11
1.3.3. PCR-HRM (“ <i>Melting</i> ” em Alta Resolução)	14
1.3.4 Sequenciamento Direto	15
2. OBJETIVOS.....	18
3. CASUÍSTICA	20
4. MÉTODOS.....	22
4.1. Extração do DNA Genômico	22
4.2. Quantificação dos Ácidos Nucleicos	22
4.3. Estudos da Amplificação do gene <i>JAK2</i>	23
4.3.1 Polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP)	23
4.3.2 Sistema de amplificação refratária de mutação (ARMS)	24
4.3.3 PCR-HRM (Análise de <i>Melting</i> em alta resolução).....	25

4.3.4 Sequenciamento Direto	26
4.3.5 Controles	27
4.4 Análises Estatísticas	27
5. RESULTADOS.....	29
5.1 PCR-RFLP	30
5.2 PCR-ARMS.....	32
5.3 PCR-HRM.....	36
5.4. SEQUENCIAMENTO DIRETO.....	37
5.5. ANÁLISE COMPARATIVA DAS DIFERENTES METODOLOGIAS.....	39
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS.....	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
>	Maior que
<	Menor que
2P	Dupla população de <i>JAK2</i> (Selvagem+Mutado)
ASXL1	<i>Additional sex combs like 1</i>
<i>BCR-ABL1</i>	Translocação BCR (breakpoint cluster region) com o gene <i>ABL1</i>
BSAXI	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CBL	Cbl proto-oncogene
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfato
ddNTPs	Didesoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO	Eritropoietina
FAM	Fosforamidita
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófago-granulócito
HEL	<i>Celulas de Eritroleucemia Imortalizada</i>
Hi-Di	Altamente deionizada (highly deionized)
IDH1	<i>isocitrate dehydrogenase 1</i>
IDH2	<i>isocitrate dehydrogenase 2</i>
Ikaros	<i>Ikaros family zinc finger protein 1</i>
<i>JAK2</i>	Gene <i>Janus Kinase 2</i>
JH1	<i>JAK homology 1</i>
JH2	<i>JAK homology 2</i>
K562	Células Humanas Imortalizadas de Leucemia Mielóide Crônica
L	Litro
LEC	Leucemia Eosinofílica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
LNC	Leucemia Neutrofílica Crônica
LNK	<i>Lymphocyte-Specific Adapter</i>
MF	Mielofibrose
MFP	Mielofibrose Primária
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

mM	Milimolar
MO	Medula óssea
MPL	<i>Myeloproliferative leukemia protein</i>
MS	Mastocitose Sistêmica
MUT	Mutado (presença de <i>JAK2V617F</i>)
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
NPMs	Neoplasias Mieloproliferativas
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-ARMS	Sistema de amplificação refratária de mutação (<i>Amplification Refractory Mutation System</i>)
PCR-HRM	PCR em Alta resolução de <i>melting</i> (<i>High-Resolution Melt Analysis</i>)
PCR-RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
pH	Potencial hidrogênio iônico
PV	Policitemia vera
<i>q.s.p</i>	Quantidade suficiente para
ROX	Padrão de Peso molecular marcado com rodamina
<i>r.p.m</i>	Rotações por minuto
SEL	Selvagem
SNP	Polimorfismos de um único nucleotídeo
STAT	Transdutor de sinal e ativador transcricional
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TE	Trombocitemia essencial
TET2	<i>Ten Eleven Translocation 2</i>
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>
TPO	Trombopoetina
U	Unidade
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromolar

Lista de Figuras

Figura 1: Classificação das Neoplasias Mielóides e anormalidades genéticas associadas, de acordo com a OMS em 2008 (Vakil & Tefferi, 2011)..... 1

Figura 2: A via de sinalização *JAK-STAT* ativada pelo interferon α . Após a sua ligação ao receptor, a tirosina *JAK2* é ativada e fosforila *STAT* promovendo uma cascata de sinalização, onde serão ativados genes de transcrição de fatores de crescimento celular (Alberts et al.,2008) 5

Figura 3: A: O domínio pseudoquinase (JH2) formando uma interação intramolecular com o domínio quinase (JH1). O domínio pseudoquinase inibe a quinase ativando o domínio JH1. A mutação *JAK2V617F* posicionada dentro do domínio pseudoquinase rompe a interação intramolecular entre JH2 e JH1. Esta substituição inibe a atividade da quinase. B: Um resultado para o rompimento da autoinibição do domínio JH2, ativação *JAK-STAT* (Macdonald & Cross, 2007). 7

Figura 4: Os receptores de *JAKs* são ativados quando a molécula reguladora (citocina) se liga e une duas moléculas receptoras para formar um dímero. O *JAK* ativado fosforila *STAT*, um fator de transcrição que, uma vez fosforilado, desloca-se para o núcleo onde se liga a sequências específicas do DNA, promovendo a proliferação e sobrevivência celular..... 7

Figura 5: Estratégia diagnóstica proposta para NMPs: Triagem inicial deve ser realizada pelo *BCR-ABL1*. Resultados positivos são diagnósticos para LMC. Se existe suspeita clínica para *BRC-ABL1* negativo, então é realizada a triagem pela mutação *JAK2V617F*. *JAK2* é diagnóstico para NMP. Uma biópsia de Medula Óssea (MO) é necessária para o diagnóstico de TE e MFP e pode ser útil na PV onde *JAK2* é Negativo (Vakil & Tefferi, 2011).....9

Figura 6: Representação da metodologia de PCR-RFLP. A: Fragmentos do mesmo tamanho gerados a partir da PCR. B: Durante a digestão, a enzima *BsaXI* cliva o DNA no seu sítio de restrição, quando há a mutação de *JAK2V617F* a sequência do sítio é alterado, logo a enzima não o reconhece e não o cliva. C: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR, tamanhos de fragmentos de 360pb. D: Eletroforese em gel de agarose do produto da digestão, nos pacientes com o *JAK2* selvagem (SEL) os fragmentos são clivados e geram fragmentos menores, com 180pb, enquanto nos pacientes com a mutação (MUT) os fragmentos se mantêm do mesmo tamanho da PCR,

e finalmente, os pacientes com dupla população (2P) apresentam os dois tamanhos de fragmento. 11

Figura 7: 1. Durante a PCR ocorre aleatoriamente um acoplamento dos oligonucleotídeos ao DNA alvo para formação de uma nova fita de DNA. Quando os oligonucleotídeos A e B formam uma fita, é gerado o fragmento controle com 463pb, esse fragmento é gerado em todos em todos os pacientes com DNA íntegro, quando há mutação o oligonucleotídeo A e D (específico para alelo mutado) formam a fita gerando um fragmento de 277pb, quando não há mutação o oligonucleotídeo C (específico para alelo selvagem) e B formam a fita e geram um fragmento de 230pb. 2. Em gel de agarose pode-se observar o padrão de bandas geradas pela PCR, em pacientes com *JAK2* Selvagem (SEL) e gerado o fragmento controle (463pb) e o alelo selvagem específico (230pb), os pacientes com a mutação (MUT) apresentam o fragmento controle e o alelo mutado específico (277pb), já o paciente que possui duas populações de *JAK2* (2P) apresenta os três fragmentos..... 12

Figura 8: Análise dos fragmentos gerados a partir da PCR ARMS submetidos à eletroforese capilar. O pico que apresenta 230pb corresponde ao alelo selvagem, enquanto o alelo mutado apresenta 277pb. Nota-se que a carga alélica de *JAK2*V617F pode variar. Em A observa-se 100% da carga alélica, B 45%, C: 25% e D 0%, o indivíduo só apresenta o *JAK2* selvagem, sem a mutação. 13

Figura 9: Representação da detecção da curva de dissociação. Durante a PCR os intercalantes de DNA se acoplam entre a dupla fita recém formada. Após o término da PCR a temperatura é aumentada gradativamente, a partir desse ponto começa a dissociação da fita dupla, logo há a liberação da fluorescência. A temperatura de cada amostra varia de acordo com sua sequência de DNA. Através da análise pelo software podemos visualizar a diferença da temperatura de dissociação de cada paciente 14

Figura 10: Representação do Sequenciamento pelo método de Sanger. Cada ddNTP possui uma fluorescência, durante a reação eles se acoplam aleatoriamente na fita de DNA, quando isso ocorre, devido sua conformação química, a extensão da fita é bloqueada. Após a reação é realizado uma eletroforese capilar onde as fitas são colocadas em ordem de tamanho e a fluorescência é reconhecida pelo software, que gera um eletroferograma, que apresenta a sequência de DNA de interesse. 16

Figura 11: A: Visualização da eletroforese dos produtos de PCR-RFLP em gel de agarose a 2% todas as amostras geram um fragmento de 360pb. B: Visualização dos mesmos produtos de PCR após a digestão com a enzima

BsaXI. Cada um apresenta um padrão de fragmentos, dependendo de sua sequência de DNA, o controle negativo (K562) e pacientes com *JAK2* selvagem (SEL) apresentam um fragmento de 180pb, já que a enzima clivou o DNA em seu sítio de restrição, o controle mutado, MUT (HEL), manteve o tamanho de 360pb já que não houve clivagem. Os pacientes que possuem as duas populações de *JAK2* (2P) apresentaram os dois fragmentos. 31

Figura 12: Reação de ARMS-PCR corridas em eletroforese capilar A: Amostra de paciente com ausência de mutação V617F apresenta pico com tamanho de 230pb; B: Amostra de paciente com a mutação V617F, apresenta pico com tamanho de 277pb; C, D e E: Pacientes com duas populações, apresentam ambos os picos (normal de 230pb e mutado de 277pb) em diferentes proporções, 25%, 50% e 80% respectivamente. 32

Figura 13: Carga alélica de *JAK2*V617F em 46 pacientes com mutação de *JAK2*. Para comparação, resultado de pacientes com PV (n=19), MFP (n=8) e TE (n=19) são apresentados. A carga alélica de *JAK2*V617F nas TE é a mais baixa ($p<0,0001$). 34

Figura 14: Visualização da análise de HRM. Na figura A é apresentado a curva de dissociação que mostra a diferença das temperaturas, através dessa diferença é possível identificar os diferentes fenótipos. O fenótipo de *JAK2* selvagem possui uma temperatura de dissociação maior, tendo em vista que na sua sequência alvo existe a ligação de G-C, que por ser mais resistente, demora mais para se dissociar. No *JAK2* mutado (*JAK2*V617F) existe uma troca de um G por um T, logo sua temperatura de dissociação é mais baixa já que a ligação de A-T é mais fácil de ser quebrada. Já nos pacientes com a dupla população, as ligações se tornam instáveis, portanto sendo ainda mais fáceis de ser quebrada em menores temperaturas. 37

Figura 15: Eletroferograma das amostras. A: corresponde a um paciente com *JAK2* selvagem: Paciente com a presença da mutação V617F e C: paciente com ambas populações, selvagem e mutada. 38

Figura 16: A: Apresenta o eletroferograma da amostra discordante, no sequenciamento ela foi considerada ausente de mutação. Nota-se, porém uma pequena linha marcando a presença de um T no local marcado em vermelho, que poderia ser observada como um ruído da reação. B: O Software possui uma ferramenta que permite solicitar a porcentagem de cada alelo. Nesse informativo o software avaliou o pequeno pico de T e calculou uma porcentagem de 8% de alelo mutado. Como a sensibilidade do teste é 10% o software não acusou a presença da mutação de *JAK2*V617F nessa amostra. 44

Figura 17: A Figura apresenta a análise do PCR-HRM, pode-se notar que a amostra com resultado discordante não apresenta o mesmo perfil de curva como as outras amostras. O ensaio foi repetido, porém a amostra se manteve com a curva semelhante. Essa diferença na análise pode ter ocorrido devido a uma baixa qualidade da amostra de DNA, que é extremamente necessária na PCR-HRM. K562: Controle Selvagem, SEL: amostra selvagem, HEL: controle positivo, 2P: Amostra com duas populações de *JAK2*..... 45

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características do grupo de pacientes incluídos no estudo: N (número de pacientes) Sexo, Doença (suspeita), Índices Hematimétricos e Esplenomegalia. 30

Tabela 2: Tabela de resultados das análises da PCR-RFLP.....31

Tabela 3: Tabela de resultados das análises da PCR-ARMS.....33

Tabela 4: Achados clínicos e laboratoriais de pacientes com PV de acordo com a carga alélica de *JAK2V617F*.....34

Tabela 5: Achados clínicos e laboratoriais de pacientes com MFP de acordo com a carga alélica de *JAK2V617F*.....35

Tabela 6: Achados clínicos e laboratoriais de pacientes com TE de acordo com a carga alélica de *JAK2V617F*.....35

Tabela 7: Tabela de resultados das análises da PCR-HRM.....36

Tabela 8: Tabela de resultados das análises do Sequenciamento Direto.....39

Tabela 9: Frequência de positividade de *JAK2V617F* através das diferentes técnicas nas NMPs.....40

RESUMO

DIDONE, A. Estudo comparativo entre diferentes metodologias na detecção da mutação *JAK2V617F* em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR-ABL1* Negativo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2015, 76f

As Neoplasias mieloproliferativas (NMP) representam um vasto grupo de doenças clonais hematológicas malignas com três elementos principais: Policitemia vera (PV), Trombocitemia essencial (TE), e Mielofibrose Primária (MFP). *JAK2* é uma proteína citoplasmática com atividade de tirosina quinase com função na transdução de várias vias na hematopoiese. A identificação da mutação do gene *JAK2* (*JAK2V617F*) nas PV, TE e MFP representa um importante avanço para a compreensão da biologia destas NMPs.

Variações marcantes na frequência desta mutação são observadas entre os diferentes estudos e acredita-se que um dos fatores responsáveis por estas diferenças seja a sensibilidade do método utilizado. Atualmente, diversas técnicas para detecção de *JAK2V617F* têm sido utilizadas, testadas e validadas quanto à sua sensibilidade e especificidade, entre elas: PCR RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ARMS PCR (*Amplification-Refractory Mutation System*), HRM (*High-Resolution Melt Analysis*) e Sequenciamento pela técnica de Sanger. Neste estudo foram realizadas todas as metodologias citadas anteriormente para a detecção da mutação de *JAK2V617F* em amostras de sangue de 136 pacientes (PV=20; MFP=20; TE=28; suspeita de NMP=68). Os resultados obtidos foram concordantes para as quatro técnicas empregadas nos pacientes com PV e MFP, já nos pacientes com TE as metodologias PCR-ARMS e PCR-HRM detectaram a mutação *JAK2V617F* em 67,8% enquanto o PCR-RFLP e o Sequenciamento pela técnica de Sanger foi 71,4% e 64,2% respectivamente. Nos casos onde houve suspeita diagnóstica de NMP também foram encontradas discordâncias entre as metodologias PCR-RFLP (4,4%) e PCR-HRM (1,5%) quando comparadas ao PCR-ARMS (3%) e o Sequenciamento (3%). O PCR-ARMS foi considerado nesse estudo como a melhor técnica para a detecção da mutação *JAK2V617F*, devido o menor risco de contaminação cruzada durante a reação, baixo tempo de execução, além da sua capacidade de determinação da carga alélica de *JAK2*, importante para o acompanhamento do paciente.

Palavras-chave: *JAK2*; Mutação *JAK2V617F*; Neoplasias Mieloproliferativas; Policitemia Vera; Trombocitemia Essencial; Mielofibrose primária

ABSTRACT

DIDONE, A. Comparative analysis among different techniques for *JAK2V617F* mutation in *BCR-ABL1* negative myeloproliferative neoplasm [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2015, 76f

Myeloproliferative neoplasms (MPN) represent a large group of clonal hematologic malignant diseases with three main members: Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET), and Primary Mielofibroses (PMF). *JAK2* is a cytoplasmic tyrosine kinase protein and is important in different signal transduction pathways. Identification of *JAK2V617F* mutation in PV, ET and PMF is an important advance for understanding the biology of MPN. Differences in the frequency of this mutation are reported among different studies and it is believed that technical sensitivity could be the major reason for this variability. Currently, several techniques for detection of *JAK2V617F* have been developed, tested and validated for their sensitivity and specificity, including: PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System), PCR-HRM (High-Resolution Melt analysis) and Sanger Direct Sequencing. The present study, evaluated all four molecular diagnostic methods mentioned above blood samples from 136 patients (PV=20; MFP=20; ET=28 and other MPN=68). Comparable results were observed for PV and PMF when all techniques were applied. Patients with diagnosis of ET *JAK2V617F* mutations were detected in 67.8% when PCR-ARMS and PCR-HRM were used whilst PCR-RFLP and direct sequencing detected 71.4% and 64.2% respectively. In 68 patients with suspicion of MPN discordant results were seen between PCR-RFLP (4.4%) and PCR-HRM (1.5%) when compared to PCR-ARMS (3%) and direct sequencing (3%) related to *JAK2V617F* frequency. In conclusion PCR-ARMS was considered the most reliable methodology for *JAK2V617F* detection by presenting the lowest risk for cross contamination, less laborious, and the ability in determining allele burden that is becoming an important tool for risk stratification.

Key-words: *JAK2*; *JAK2V617F*; Myeloproliferative diseases; Polycythemia Vera; Essential Thrombocythemia; Primary Mielofibroses

1. INTRODUÇÃO

Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs) são doenças clonais de célula-tronco hematopoiética, nas quais há proliferação aumentada das séries mielóides com maturação eficaz, o que leva à leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocitária ou trombocitose (Chauffaille, MLLF 2010). Várias NMPs progridem para fibrose medular ou transformação leucêmica (Swedlow SH, et al 2008). De acordo com a reclassificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2008, estão inclusas: leucemia mielóide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) mielofibroses primárias (MFP), leucemia eosinofílica crônica (LEC), leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), leucemia neutrofílica crônica (LNC), mastocitose sistêmica (MS) e NMPs inclassificáveis (Figura 1) (Vakil & et al, 2011)

Figura 1: Classificação das Neoplasias Mielóides e anormalidades genéticas associadas, de acordo com a OMS em 2008 (Vakil & Tefferi, 2011).

As principais neoplasias mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativo são três: policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e as mielofibroses primárias (MFP). Essas doenças são hematologicamente malignas e são originadas a partir da transformação das células-tronco hematopoiéticas multipotentes. A hematopoiese clonal é característica da PV, TE e em alguns casos de MFP. Exceto desta última, todas as outras mieloproliferações são caracterizadas pelo aumento da produção das células sanguíneas com predominância da linhagem mielóide sem alterações na maturação das células. Cada uma das neoplasias mieloproliferativas tem maior propensão para a leucemia mielóide aguda (LMA). As complicações associadas às neoplasias mieloproliferativas, assim como a trombose na TE e na PV, estão relacionadas com o aumento da produção destas células maduras no sangue periférico (Vainchenker & Constantinescu, 2005).

1.1 Neoplasias Mieloproliferativas Cromossoma Filadélfia Negativo

1.1.1. Policitemia Vera

A PV é uma doença neoplásica clonal que se caracteriza pela proliferação excessiva de células eritróides, mielóides e dos elementos megacariocíticos dentro da medula óssea independentemente da ação dos mecanismos habituais de regulação da eritropoiese (Chauffaille, 2010) (Swerdlow et al., 2008).

É uma doença rara e incide preferencialmente em pacientes que se encontram na sexta e sétima décadas de vida (0,7 a 2,5 casos por 100.000 habitantes/ano), com média de sobrevida, após o diagnóstico, de aproximadamente 15 anos. É mais frequente em homens que em mulheres. Trombose costuma ser a causa mais comum de morte e na fase tardia da doença há risco de fibrose medular ou transformação em leucemia aguda (Swerdlow, et al 2008).

A principal manifestação clínica da PV se deve diretamente a proliferação excessiva dos elementos celulares das diferentes linhagens hematopoiéticas envolvidas neste processo (Hoffman et al., 2008)

1.1.2. Trombocitemia Essencial

A TE também denominada trombocitemia idiopática, trombofilia essencial ou trombocitose essencial, é caracterizada pela proliferação exagerada de megacariócitos na medula óssea, levando ao aumento persistente de plaquetas circulantes. Além do número elevado de plaquetas ($>600 \times 10^9/L$), essa doença é caracterizada pela esplenomegalia importante e um curso clínico de episódios trombóticos e ou hemorrágicos (Leite et al., 2001).

A incidência da doença é de 1 a 2 casos por 100.000 habitantes/ano (Chauffaille, MLLF 2010). A idade média ao diagnóstico está entre os 50 e 60 anos. É relatada TE em crianças, mas é um achado extremamente raro (Kapoor et al., 1996). Os mecanismos que levam à trombocitose ainda não são totalmente conhecidos, mas existem relatos de produção anormal de plaquetas tanto quantitativa como qualitativamente, oriundas de um clone de megacariócitos anormais.

Quanto às manifestações clínicas, aproximadamente 85% dos casos são assintomáticos, sendo o diagnóstico feito na maioria das vezes acidentalmente. Quanto ao prognóstico, a TE tem um curso menos agressivo quando comparado às outras Neoplasias mieloproliferativas, isto devido à sua baixa transformação leucêmica ($<2\%$) nos casos não tratados (Leite et al., 2001).

1.1.3. Mielofibroses

É doença clonal originada a partir da transformação neoplásica de célula hematopoiética pluripotente (célula-tronco) acompanhada de alterações reacionais intensas do estroma medular com fibrose colagênica, osteosclerose e angiogênese (Chauffaille, 2010).

Estima-se uma incidência de 0,5 a 1,5 casos por 100.000 habitantes/ano. A doença tem duas fases: fase pré-fibrótica, inicial, com medula óssea hiper celular que evolui para a fase fibrótica, tardia, que consiste na substituição do tecido hematopoiético por fibras reticulínicas.

A sobrevida varia de 3 a 10 anos. As causas de óbito, geralmente, são: transformação leucêmica (em 5% a 10% dos casos), infecção, sangramento, trombose, falência respiratória, cardíaca, hepática, hipertensão arterial e aparecimento de outras neoplasias (Chauffaille, 2010) (Swerdlow et al., 2008).

1.2. Distúrbios Genéticos Envolvidos nas NMPs

JAK2V617F é a mutação que caracteriza melhor as NMPs *BCRABL1* negativo, porém mutações nos genes *MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *CBL*, *Ikaros* e *LNK* foram descritas com frequências variáveis em NMPs, algumas estão envolvidas na ativação da sinalização *JAK/STAT*, outras na remodelação da cromatina e outras na transformação leucêmica (Passamonti et al., 2011). Todavia, seu papel na classificação e diagnóstico ainda não foi estabelecido (Vakil & Tefferi, 2011).

1.2.1 Janus Kinase (JAK)

O gene *Janus Kinase 2* (*JAK2*) é responsável por fornecer instruções para a produção de uma proteína que promove o crescimento e proliferação celular. Esta proteína faz parte de uma via de sinalização designada via *JAK/STAT* que transmite sinais químicos do exterior da célula para o núcleo, sendo particularmente importante no controle da produção de células sanguíneas a partir de células tronco hematopoiéticas (Spivak, 2010).

A proteína *JAK2*, pertencente à família das Janus Quinases (Levine & Gilliland, 2008), sendo uma tirosina-quinase que quando fosforilada, em resposta à ação de diversas citocinas, ativa diferentes vias de sinalização intracelular e assim participando no processo de transdução de sinal (Spivak, 2010) (Monte-Mór & Costa, 2008) (Figura 2). Esta transdução participa da sinalização de múltiplos receptores hematopoiéticos de crescimento (Baxter, 2005).

Figura 2: A via de sinalização *JAK-STAT* ativada pelo interferon α . Após a sua ligação ao receptor, a tirosina *JAK2* é ativada e fosforila *STAT* promovendo uma cascata de sinalização, onde serão ativados genes de transcrição de fatores de crescimento celular (Alberts et al., 2008).

JAK2 é ativado através da ligação de citocinas, como: interferon, Eritropoietina (EPO), Fator estimulador de colônias de macrófago-granulócito (GM-CSF) e Trombopoetina (TPO), aos receptores (Spivak, 2010) (Jones et al., 2005). Esta ligação tem como resultado a produção de eritrócitos, macrófagos/granulócitos e plaquetas respectivamente (Paradis et al., 2010). A via de sinalização *JAK/STAT* é uma das várias cascatas usadas para traduzir múltiplos sinais de desenvolvimento e hemostase em animais, desde humanos a insetos (Rawlings et al., 2004). A ativação da proteína *JAK* estimula a proliferação celular, diferenciação, migração celular. Estes eventos celulares são críticos para a hematopoiese, desenvolvimento imunitário, desenvolvimento de glândulas mamárias e lactação, entre outros processos. (Rawlings et al., 2004) (Won et al., 2009)

Previsivelmente, mutações que reduzam a atividade da via *JAK/STAT* afetam estes processos. Por outro lado, mutações que constitutivamente possam ativar ou levar a uma falha na regulação desta via, podem causar doenças inflamatórias, eritrocitose, gigantismo e vários tipos de leucemias (Won et al., 2009).

1.2.2. Mutação *JAK2V617F* do Gene *JAK2*

Em 2005, a mutação no gene *JAK2*, *JAK2V617F*, foi identificada em distúrbios mielóides crônicos, mais frequentemente na PV (65-97%), TE (23-57%) e MFP (35-57%) (McCLure et al., 2006). É uma mutação pontual que resulta em um aumento na atividade quinase no domínio pseudoquinase (JH2) (Figura 3) no éxon 14, que resulta na transversão de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 1849 (1849G>T), com substituição de uma valina por uma fenilalanina no códon 617 (V617F) resultando na ativação da via de regulação de *JAK/STAT* (Figura 4) conferindo o crescimento de linhagens celulares independente da presença de citocinas necessárias para o crescimento celular. Análises de DNA demonstraram que *JAK2V617F* é uma

mutação somática em progenitores hematopoiéticos (Vakil & Tefferi, 2011) (McClure et al., 2006) (Levine & Wernig, 2006).

Figura 3: A: O domínio pseudoquinase (JH2) formando uma interação intramolecular com o domínio quinase (JH1). O domínio pseudoquinase inibe a quinase ativando o domínio JH1. A mutação *JAK2V617F* posicionada dentro do domínio pseudoquinase rompe a interação intramolecular entre JH2 e JH1. Esta substituição inibe a atividade da quinase. B: Um resultado para o rompimento da autoinibição do domínio JH2, ativação *JAK-STAT* (Macdonald & Cross, 2007).

Figura 4: Os receptores de *JAKs* são ativados quando a molécula reguladora (citocina) se liga e une duas moléculas receptoras para formar um dímero. O *JAK* ativado fosforila *STAT*, um fator de transcrição que uma vez fosforilado desloca-se para o núcleo onde se liga a sequências específicas do DNA, promovendo a proliferação e sobrevivência celular (Levy & Darnell, 2002).

A identificação da mutação *JAK2V617F* nas PV, TE e MFP representa um importante avanço para a compreensão dessas NMPs (Levine & Wernig, 2006).

Um estudo realizado por Scott e cols. em 2005, identificou que a mutação *JAK2V617F* não ocorre em tumores não hematológicos, essa mutação está presente somente em linhagens celulares de leucemias, como a HEL e HEL-92.1.7 (Scott et al., 2005).

Embora a mutação *JAK2V617F* tenha sido identificada em muitos pacientes com PV, TE e MFP, uma significativa proporção de pacientes com TE e MFP não apresentam esta mutação. A presença de hematopoiese clonal é observada em pacientes com NMPs mesmo na ausência de *JAK2V617F*, sugerindo que outras vias de sinalização poderiam estar envolvidas nesse processo (Levine et al., 2007)

1.3. Diagnóstico das NMPs

A descoberta da mutação *JAK2V617F* abriu uma nova era na área de conhecimento da biologia das NMPs, evolução clínica e terapia (Kiladjian, 2012) O passo inicial para um diagnóstico preciso deve ser a exclusão da translocação *BCR-ABL1* em pacientes que apresentam sinais, sintomas, ou valores laboratoriais consistentes com PV, TE, ou MFP.

Triagem para *JAK2V617F* pode ajudar no diagnóstico das NMPs, principalmente na PV já que esta mutação está presente em até 95% dos casos e desta forma se eliminaria a necessidade de biópsia de medula óssea. Os critérios diagnósticos específicos são apresentados na figura 5 (Vakil & Tefferi, 2011).

Figura 5: Estratégia diagnóstica proposta para NMPs: Triagem inicial deve ser realizada pelo *BCR-ABL1*. Resultados positivos são diagnósticos para LMC. Se existe suspeita clínica para *BCR-ABL1* negativo, então é realizada a triagem pela mutação *JAK2V617F*. *JAK2* é diagnóstico para NMP. Uma biópsia de Medula Óssea (MO) é necessária para o diagnóstico de TE e MFP e pode ser útil na PV onde *JAK2* é Negativo (Vakil & Tefferi, 2011).

A descoberta de mutações, principalmente *JAK2V617F*, em pacientes com NMPs têm implicações diretas para a abordagem clínica, ou seja, diagnóstico, prognóstico e terapia destas doenças (Ho et al., 2012).

Neste sentido, um aspecto relevante a ser considerado é a detecção de *JAK2V617F*. Variações marcantes na frequência da mutação são observadas entre os diferentes estudos e acredita-se que um dos fatores responsáveis por estas diferenças seja a sensibilidade do método utilizado.

Atualmente, metodologias altamente sensíveis estão sendo utilizadas para determinação da presença da mutação *JAK2V617F* (Rapado et al., 2009). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas, testadas e validadas quanto a sua sensibilidade e especificidade, entre elas: PCR RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ARMS PCR (*Amplification Refractory Mutation System*)

PCR HRM (*High-Resolution Melt Analysis*) e Sequenciamento direto, cada um destes métodos tem suas próprias vantagens e limitações, incluindo sensibilidade, facilidade de utilização e de instrumentação (Cao et al., 2011).

1.3.1. PCR-RFLP (Polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição)

O PCR-RFLP é um método de detecção da mutação *JAK2V617F* mais comumente utilizado, baseia-se na utilização de enzimas de restrição para detecção de mutações e polimorfismos genéticos (Lay et al., 2006).

As enzimas de restrição reconhecem sítios específicos na sequência do DNA que é clivada somente quando o sítio está presente, gerando fragmentos de tamanhos diferentes que são separados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Ono et al., 2012).

A enzima utilizada nessa metodologia é a BsaXI (New England Biolabs®), que reconhece o sítio de restrição 5'...9(N) A C (N)5 C T C C (N)10...3', 3'12(N) T G (N)5 G A G G (N)7...5'que coincide na mesma região que onde pode ocorrer a mutação de *JAK2617F*, portanto após a digestão o fragmento contendo a sequência de DNA selvagem é clivado. Na presença da mutação, a sequência do DNA é alterada, logo, a enzima não reconhece mais o sítio de restrição e não ocorre clivagem, mantendo o DNA intacto. Durante a digestão, o DNA pode ser clivado ou não, originando até dois fragmentos dependendo de sua sequência, se a mutação estiver presente nas duas fitas do DNA teremos somente um fragmento de 360pb, se não houver a presença de mutação teremos um fragmento de 180pb e finalmente se a mutação só estiver presente em uma fita do DNA teremos assim dois fragmentos, um de 180pb e outro de 360pb observados no gel de agarose a 2%.

Figura 6: Representação da metodologia de PCR-RFLP. A: Fragmentos do mesmo tamanho gerados a partir da PCR. B: Durante a digestão, a enzima BsaXI cliva o DNA no seu sitio de restrição, quando há a mutação de JAK2V617F a sequência do sítio é alterado, logo a enzima não o reconhece e não o cliva. C: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR, tamanhos de fragmentos de 360pb. D: Eletroforese em gel de agarose do produto da digestão, nos pacientes com o JAK2 selvagem (SEL) os fragmentos são clivados e geram fragmentos menores, com 180pb, enquanto nos pacientes com a mutação (MUT) os fragmentos se mantêm do mesmo tamanho da PCR, e finalmente, os pacientes com dupla população (2P) apresentam os dois tamanhos de fragmentos.

1.3.2. ARMS-PCR (Sistema de amplificação refratária de mutação)

O ARMS-PCR é um procedimento originalmente desenvolvido para a análise de polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* - SNP), que emprega dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para amplificar, simultaneamente, os dois alelos diferentes de um SNP em uma

única reação de PCR (Vannuchi et al., 2006). O protocolo foi originalmente descrito por Jones e cols. 2005.

Essa técnica é baseada na amplificação de um fragmento controle do gene *JAK2*, utilizando dois oligonucleotídeos iniciadores externos, gene-específicos, que dão origem a um fragmento de 463pb que é utilizado como controle. Adicionalmente, dois oligonucleotídeos iniciadores alelo-específicos internos, um senso específico para a forma selvagem do gene que gera um fragmento de 230pb e outro anti-senso mutação-específico que dá origem a um fragmento de 277pb (Figura 7). Os fragmentos alelo-específicos gerados, possuem tamanhos distintos, assim, é possível visualizá-los e estudá-los em uma só reação (Trifa et al., 2009).

Para melhor visualização dos fragmentos, a eletroforese em gel de agarose foi substituída pela eletroforese capilar, adicionando fluorescência 6-fosforamidita (FAM) na extremidade 3' dos oligonucleotídeos iniciadores alelo-específico. Com o uso da eletroforese capilar também é possível fazer a quantificação da carga alélica do *JAK2V617F*, pois o software mostra a área de cada pico gerado pela reação, assim pode-se ter um valor aproximado da quantidade de *JAK2* mutado existente no DNA do paciente, como mostra a figura 8.

Figura 7: 1. Durante a PCR ocorre aleatoriamente um acoplamento dos oligonucleotídeos ao DNA alvo para formação de uma nova fita de DNA. Quando os oligonucleotídeos A e B formam uma fita, é gerado o fragmento controle com 463pb, esse fragmento é gerado em todos em todos os pacientes com DNA íntegro, quando há mutação o oligonucleotídeo A e D (específico para alelo mutado) formam a fita gerando um fragmento de 277pb, quando não há mutação o oligonucleotídeo C (específico para alelo selvagem) e B formam

a fita e geram um fragmento de 230pb. 2. Em gel de agarose pode-se observar o padrão de bandas geradas pela PCR, em pacientes com *JAK2* selvagem (SEL) e gerado o fragmento controle (463pb) e o alelo selvagem específico (230pb), os pacientes com a mutação (MUT) apresentam o fragmento controle e o alelo mutado específico (277pb), já o paciente que possui duas populações de *JAK2* (2P) apresenta os três fragmentos.

Figura 8: Análise dos fragmentos gerados a partir da PCR ARMS submetidos à eletroforese capilar. O pico que apresenta 230pb corresponde ao alelo selvagem, enquanto o alelo mutado apresenta 277pb. Nota-se que a carga alélica de *JAK2V617F* pode variar. Em A observa-se 0% da carga alélica mutada, B: 50% e C: 95%.

1.3.3. PCR-HRM (“*Melting*” em Alta Resolução)

A técnica de PCR-HRM é usada para a detecção de mutações de genes ou SNPs através da análise em alta resolução do “*Melting*”, ou seja, baseia-se na diferença de temperatura necessária para dissociação da dupla fita de DNA em fita simples.

A análise de *High Resolution Melting* (HRM) é uma técnica recente que consiste na caracterização de amostras de DNA de acordo com seu comportamento de dissociação durante sua transição de DNA dupla fita para DNA fita simples com o aumento da temperatura.

Na PCR são utilizados corantes fluorescentes que se intercalam ao DNA dupla fita, após a PCR há um aumento gradativo de temperatura, é nesse momento que ocorre a desnaturação do DNA, onde os corantes são liberados e a fluorescência diminui, gerando a curva de dissociação deste modo essas informações são detectadas e enviadas para o software. As diferenças da composição de bases do DNA podem ser detectadas e comparadas através da curva e temperatura de *melting* (T_m), assim como ilustrado na Figura 9. Através dessas informações é gerado um gráfico diferencial e a partir daí obtidos os resultados (Type-it, 2009).

Figura 9: Representação da detecção da curva de dissociação. Durante a PCR os intercalantes de DNA se acoplam entre a dupla fita recém-formada. Após o término da PCR a temperatura é aumentada gradativamente, a partir desse ponto começa a dissociação da fita dupla, logo há a liberação da fluorescência. A temperatura de cada amostra varia de acordo com sua sequência de DNA.

Através da análise pelo software podemos visualizar a diferença da temperatura de dissociação de cada paciente.

1.3.4 Sequenciamento Direto

Na reação de sequenciamento direto pelo método de Sanger utilizam-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs), que diferentes dos desoxinucleotídeos (dNTPs), não possuem uma hidroxila na posição 3'. Logo, se forem incorporados a uma fita de DNA, interrompem a incorporação de outros nucleotídeos a partir dele. Os ddNTPs são marcados cada um com uma fluorescência, durante a reação, cria-se uma série de fragmentos de DNA, que são selecionados pelo gel de acordo com o tamanho de cada um. Cada fragmento é marcado com o corante fluorescente que corresponde ao seu ddNTP incorporado no fim da cadeia; desse modo, a cor emitida pelo fragmento identifica qual é a base. Essas informações são alimentadas diretamente em um computador (Lehninger et al., 2004)(Figura 10).

Figura 10: Representação do sequenciamento pelo método de Sanger. Cada ddNTP possui uma fluorescência, durante a reação eles se acoplam aleatoriamente na fita de DNA, quando isso ocorre, devido sua conformação química, a extensão da fita é bloqueada. Após a reação é realizada uma eletroforese capilar onde as fitas são colocadas em ordem de tamanho e a fluorescência é reconhecida pelo software, que gera um eletroferograma, que apresenta a sequência de DNA de interesse.

2. OBJETIVOS

- Avaliar diferentes técnicas moleculares na identificação da mutação V617F do gene *JAK2* em amostras de sangue enviadas ao Laboratório de Biologia Tumoral da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP com suspeita de Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativo.
- Comparar os resultados das técnicas PCR-ARMS, HRM e Sequenciamento direto com a técnica PCR-RFLP devido esta última ser a mais utilizada em diferentes laboratórios.

3. CASUÍSTICA

O presente projeto foi aprovado pela CAPPesq (Comitê de ética para análise de projetos de pesquisa) e tem como registro o número On Line-CAPPesq 9371 do ano de 2012.

Foram utilizadas 136 amostras de sangue periférico de pacientes, que apresentavam suspeita de NMP *BCR-ABL1* negativo, todas foram enviadas ao Laboratório de Biologia Tumoral do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012.

4. MÉTODOS

4.1. Extração do DNA Genômico

Para a extração do DNA genômico do sangue periférico foi utilizado o protocolo do Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK).

Foram pipetados 200µL de sangue em um tubo de polipropileno de 1,5mL, adicionados 20µL de proteinase K e adicionados 400µL de *Lysis Solution*. A solução foi agitada vigorosamente por 20 segundos, incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, o conteúdo foi transferido do tubo de polipropileno para a coluna com o tubo coletor sendo centrifugado por 1 minuto a 11.000 r.p.m., em seguida o conteúdo do coletor foi descartado, na coluna foram adicionados 500µL de *Lysis Solution* e centrifugado por 1 minuto a 11.000 r.p.m.. Novamente o conteúdo do coletor foi descartado e na coluna foram adicionados 500µL de *Wash Buffer* em seguida centrifugado novamente por 3 minutos a 11.000 r.p.m.. O tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para um tubo de polipropileno estéril de 1,5µL, então foram adicionados 50µL de água Milli-Q a 70°C, incubado por 1 minuto em temperatura ambiente e finalmente centrifugado por 1 minuto a 14.000 r.p.m.. Todos os DNAs foram armazenados em temperatura de -30 a -15°C.

4.2. Quantificação dos Ácidos Nucleicos

As concentrações de DNA foram determinadas por espectrofotometria no equipamento NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, UNISCIENCE, USA) no qual foram utilizados os comprimentos de onda 260 e 280nm.

44.3. Estudos da Amplificação do gene *JAK2*

4.3.1 Polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP)

1º Etapa: PCR

Para o estudo da amplificação do gene *JAK2* através da técnica RFLP foi utilizada primeiramente uma reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação compreendeu os seguintes reagentes: 180 µg de DNA genômico, 1 µL de oligonucleotídeos iniciadores senso (5' TGC TGA AAG TAG GAG AAA GTG CAT 3') 10pmoles, 1 µL de oligonucleotídeos iniciadores anti-senso (5' TCC TAC AGT GTT TTC AGT TTC AA 3') 10pmoles, 2,5 µL de Tampão de Reação 5X, 0,5 µL dNTP 10mM, 0,75 µL MgCl₂ 25 mM, 0,15 µL enzima Platinum® Taq polimerase (Invitrogen™, USA) e água estéril q.s.p. 30 µL.

A reação foi submetida às seguintes condições: aquecimento inicial de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos. A reação foi realizada no termociclador automático Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA).

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio (10mg/mL) em tampão de corrida TAE 1X (Tris-base 0,8M, 2mL de EDTA 40mM, Acetato de sódio 0,26M, pH 8,0) com o intuito de avaliar se houve a amplificação do fragmento de 360pb e se não ocorreu contaminação.

2º Etapa: Enzima de Restrição

O produto amplificado foi submetido à digestão com a utilização da enzima de restrição BsaXI (BioLabs® Inc, New England).

A digestão foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante: 6 µL de produto da reação de PCR, 2 µL de Tampão de enzima 10X, 0,5 µL da enzima de restrição BsaXI (2U/ µL) e água estéril q.s.p 20 µL

Este material foi submetido à temperatura de 37°C por 120 minutos e 10 minutos a 65 °C. Após esse período, as amostras foram submetidas novamente à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo 10mg/mL de brometo de etídio em tampão de corrida TAE (1X). Foram obtidos fragmentos de 360pb e 180pb, que correspondem aos alelos mutado e selvagem, respectivamente.

4.3.2 Sistema de amplificação refratária de mutação (ARMS)

A reação compreendeu os seguintes reagentes: 2,5µL de oligonucleotídeos iniciadores externos senso (5' TCC TCA GAA CGT TGA TGG GAG 3') e anti-senso (5' ATT GCT TTC CTT TTT CAC AAG AT 3') 10pmoles; 1,25µL de oligonucleotídeos iniciadores marcados específicos para a forma selvagem (FAM - 5' GCA TTT GGT TTT AAA TTA TGG AGT ATA TG 3') e para a mutação (FAM - 5' GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA AAA 3') 10pmoles, 25ng de DNA, 0,5 µL de dNTP 10mM, 1,5 µL de MgCl₂ 50mM, 1,75µL de tampão de enzima 10X, 0,1µL da enzima DNA polimerase (5U/µL) AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) e água estéril q.s.p 20µL.

As reações foram submetidas às seguintes condições: aquecimento inicial de 95°C por 11 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56,2°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidos por um aquecimento de 94°C por 30 segundos e uma extensão final de 60°C por 45 minutos. A reação foi realizada no termociclador automático Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA).

Para a realização da análise dos fragmentos foram utilizados 1,5 µL do produto de PCR, 0,25µL GeneScan™ 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) e 8,25µL de Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese capilar no sequenciador de DNA automático 3130 Genetic Analyser™ (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) utilizando protocolo padrão e analisados no software Gene Mapper® ID V3.2 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). Os fragmentos com 230pb representam o alelo selvagem e os fragmentos com 277pb representam o alelo mutado. Os indivíduos com ausência da mutação *JAK2V617F* apresentaram apenas o fragmento de 230pb, enquanto os indivíduos com a presença da mutação apresentaram um fragmento de 277pb e os pacientes com duas populações apresentaram os dois fragmentos.

4.3.3 PCR- HRM (Análise de *Melting* em alta resolução)

Foi utilizado o reagente KAPA™ HRM FAST PCR kit (KAPA™ Biosystems USA). O protocolo de HRM foi realizado conforme as instruções do fabricante descritas resumidamente a seguir.

Cada reação foi realizada contendo os seguintes componentes: 10µL de KAPA™ HRM Master Mix™ 2X, 0,4µL de oligonucleotídeos iniciadores senso (5' AGC AAG CTT TCT CAC AAG CA 3') e antissenso (5' CTG ACA CCT AGC TGT GAT CCT G 3') 10pmoles, 2µL de MgCl₂ 25mM, 25ng de DNA e água estéril q.s.p. 20µL.

A reação foi submetida às seguintes condições: aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 10 segundos e 72°C por 10 segundos, seguido pelo *melting* de 65°C a 95°C por 2 segundos em cada temperatura.

As reações de PCR-HRM foram realizadas e analisadas no RotorGene 6000™ real-time analyzer (Corbett Life Sciences, Mortlake, Australia).

As curvas de HRM foram analisadas de acordo com gráfico diferencial, tendo como normalizador o controle positivo. As amostras foram analisadas de acordo com o perfil dos controles.

4.3.4 Sequenciamento Direto

Primeiramente foi realizada uma PCR na qual compreendeu os seguintes reagentes: 100 µg de DNA, 1µL de oligonucleotídeos iniciadores senso (5' TGC TGA AAG TAG GAG AAA GTG CAT 3') 10pmoles, 1µL de oligonucleotídeos iniciadores anti-senso (5' TCC TAC AGT GTT TTC AGT TTC AA 3') 10pmoles, 2,5 µl de Tampão de Reação 5X, 0,5µL dNTP 10mM, 0,75µL MgCl₂ 25 mM, 0,15µL enzima Platinum ®Taq polimerase (Invitrogen[™], USA) e água estéril q.s.p. 30µL.

A reação foi submetida às seguintes condições: aquecimento inicial de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

A reação foi realizada no termociclador automático Veriti® thermal cycler (Applied Biosystems[™], Foster City, CA, EUA).

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, com o intuito de avaliar se houve a amplificação do fragmento de 360pb e se não ocorreu contaminação.

Após a PCR, foi realizada a reação de sequenciamento, utilizando o kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 (Applied Biosystems[™], Foster City, CA, EUA).

Para o sequenciamento foram utilizados 1µL de Big Dye; 1µL de Tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH9,0 + 5 mM MgCl₂); 1 µL de oligonucleotídeo iniciador senso e antissenso 5pmoles, 2µL de produto da PCR purificado pela enzima ExoSAP-IT® (Affymetrix, USA) e água estéril q.s.p. 10 µL. A reação foi submetida às seguintes condições: aquecimento a 96°C por 1 minuto, seguido por 40 ciclos contendo três etapas: 94°C por 10 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 2 minutos.

Após a reação de sequenciamento, o conteúdo foi transferido para uma placa de 96 poços (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems[™], Foster City, CA, EUA).submetido à precipitação utilizando álcool isopropílico (isopropanol) na concentração de 65%, permaneceu incubado por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, posteriormente foi

centrifugado por 50 minutos a 4.000 r.p.m.. O excesso de isopropanol foi retirado através da inversão da placa em papel toalha e posterior centrifugação por 1 minuto a 600 r.p.m.

Com a placa totalmente seca, foi adicionado 10µL de Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), para que ocorresse a desnaturação das fitas de DNA, a placa foi submetida por 3 minutos a 95°C e acondicionada no gelo por aproximadamente 5 minutos.

Os produtos foram submetidos à eletroforese capilar no sequenciador de DNA automático 3130 Genetic Analyser™ (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) utilizando protocolo padrão e analisados no software Mutation Surveyor® V4.0.5 (SoftGenetics, LLC. State College, USA) utilizando a sequência nm_004972 (GeneBank) como referência.

4.3.5 Controles

Todas as reações contaram com três controles: Controle de contaminação (ausente de material genético); controle positivo para a mutação JAK2V617F (DNA de linhagens celulares de Eritroleucemia, HEL) e controle negativo (DNA de células imortalizadas de Leucemia Mielóide Crônica, K562).

4.4 Análises Estatísticas

Os Índices hematimétricos foram analisados através do teste T por amostras independentes, a técnica de PCR-RFLP foi escolhida como referência. Para a comparação dos diferentes métodos de detecção foi realizado o teste χ^2 ou Fisher exato. O software utilizado foi o software SPSS version 16.0. e o nível de significância foi de 5% para ambos os testes.

5. RESULTADOS

Os resultados foram analisados em um ensaio duplo cego, por investigadores independentes sendo que a análise final foi comparada, em caso de resultados divergentes foi solicitado um terceiro investigador para analisar a amostra discordante.

Foram analisadas 136 amostras de sangue periférico de pacientes com suspeita de NMPs, dentre elas 20 com suspeita de PV (30%), 20 com MFP (30%) e 28 com suspeita de TE (40%). As 68 amostras restantes não apresentavam quadro sugestivo de nenhuma das doenças mencionadas acima. Na tabela 1 estão as características de todos os pacientes estudados e o resultado da análise da mutação *JAK2V617F* através da técnica de PCR-RFLP. Esta metodologia foi escolhida com padrão ouro, pois foi a primeira a ser descrita e é a mais utilizada pelos laboratórios institucionais como também por laboratórios privados (Lay et al., 2006).

Todas as amostras foram submetidas aos métodos PCR-ARMS, PCR-HRM e Sequenciamento Direto e tiveram os resultados comparados com a técnica PCR-RFLP.

Tabela 1. Achados clínicos e laboratoriais do grupo de pacientes incluídos no estudo: N (numero de pacientes) Sexo, Doença (suspeita), Índices Hematimétricos e Esplenomegalia.

	JAK2 Mutado n: 50	JAK2 Selvagem n:86	Valor de p
SEXO	21	48	
Masculino	29	38	0,084
Feminino			
DOENÇAS			
Policitemia Vera	19(38)	1(1,1)	<0,0001
Mielofibrose Primária	8(16)	12(14)	
Trombocitemia Essencial	20(40)	8(9,3)	
Suspeita de NMP	3(6)	65(75,6)	
ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS(média)			
Hemácias (milhões/mm ³)	5,3(6)	4,5	0,011
Hemoglobina (g/dL)	14,3	13,3	0,115
Hematócrito(%)	44	40,2	0,079
Leucócitos (mil/mm ³)	12,2(3)	10	0,178
Plaquetas (mil/mm ³)	556(3)	350	0,001
ESPLENOMEGALIA			
Não Palpável	39(78)	46(53,4)	0,24
Palpável	6(12)	12(14)	
Sem Informação	5(10)	28(32,6)	

5.1 PCR-RFLP

A técnica PCR-RFLP foi realizada segundo o item 4.3.1, após a análise do gel de agarose a 2%, observou-se que, a mutação de *JAK2V617F* ocorreu em 95% das amostras de com suspeita de PV (19/20), 40% de MFP (8/20), 71% de TE (20/28) e 4% nas amostras com suspeita de NMPs (3/68) (Tabela 2).

Tabela 2 : Tabela de resultados das análises do PCR-RFLP.

PCR -RFLP			
<i>JAK2</i> V617F	+	-	Total
PV	19 (95%)	01 (5%)	20
MFP	08 (40%)	12 (60%)	20
TE	20 (71%)	08 (29%)	28
Suspeitas NMPs	03 (4%)	65 (96%)	68
Total	50 (37%)	86 (63%)	136

Na figura 11 observa-se o amplicon de 360pb resultante da PCR, quando submetido à digestão enzimática com BsaXI pode resultar em três situações: presença de mutação em toda a população de células estudadas que pode ser identificada pelo fragmento de 360pb; duas populações celulares onde se nota um fragmento de 360pb e outro de 180pb e a forma selvagem que apresenta somente uma população identificada pelo fragmento 180pb.

Figura 11: A: Visualização da eletroforese dos produtos de PCR-RFLP em gel de agarose a 2%, todas as amostras geram um fragmento de 360pb. B: Visualização dos mesmos produtos de PCR após a digestão com a enzima BsaXI. Cada um apresenta um padrão de fragmentos, dependendo de sua sequência de DNA, o controle negativo (K562) e pacientes com *JAK2* selvagem (SEL) apresentam um fragmento de 180pb, já que a enzima clivou o DNA em

seu sítio de restrição, o controle mutado, MUT (HEL), manteve o tamanho de 360pb já que não houve clivagem. Os pacientes que possuem as duas populações de *JAK2* (2P) apresentaram os dois fragmentos.

5.2 PCR-ARMS

Na técnica de PCR-ARMS podemos detectar a troca de uma única base nitrogenada sob condições ideais de PCR. Esta técnica parece ser ideal para detectar a troca da guanina pela timina (transversão) que irá originar a mudança do aminoácido Valina pela Fenilalanina. Esta técnica identifica dois fragmentos, sendo um de 230pb (Figura 12A), que corresponde ao amplicon selvagem e um de 277pb (Figura 12B), que apresenta a mutação V617F (Figura 12). Quando analisados os resultados notou-se que o número de pacientes positivos para a mutação V617F foi concordante com a técnica PCR-RFLP nas amostras de pacientes com PV, MFP e nos pacientes com suspeita de NMPs. Nos Pacientes com TE houve discordância em um paciente (3,5%) onde não foi detectada a mutação.

Figura 12: Reação de ARMS-PCR corridas em eletroforese capilar A: Amostra de paciente com ausência de mutação V617F apresenta pico com tamanho de 230pb; B: Amostra de paciente com a mutação V617F, apresenta pico com tamanho de 277pb; C, D e E: Pacientes com duas populações, apresentam ambos os picos (selvagem de 230pb e mutado de 277pb) em diferentes

proporções, demonstram carga alélica mutada de 25%, 50% e 80% respectivamente.

A técnica de PCR-ARMS permite, além de detectar a presença da mutação, mensurar a carga de alelos com a mutação *JAK2V617F*. A carga alélica é mensurada através do cálculo onde o valor da área do *JAK2V617F* é dividido pela área do *JAK2* total (*JAK2* selvagem + *JAK2V617F*) esse valor é multiplicado por 100, resultando na porcentagem de carga alélica, por exemplo, na figura 12 (Vannuchi et al.,2006).

Após a realização da PCR de acordo com o item 4.3.2, foi observada a presença da mutação *JAK2V617F* através das análises dos picos gerados pela técnica de PCR-ARMS em 95% das amostras de com suspeita de PV (19/20), 40% de MFP (8/20), 68% de TE (19/28) e 3% nas amostras com suspeita de NMPs (2/68) (Tabela 3).

Tabela 3: Tabela de resultados das análises do PCR-ARMS.

	PCR -ARMS		
	<i>JAK2V617F</i>	+	-
			Total
PV	19 (95%)	01 (5%)	20
MFP	08 (40%)	12 (60%)	20
TE	19 (68%)	09 (32%)	28
Suspeitas NMPs	02 (3%)	66 (97%)	68
Total	48(35%)	88 (65%)	136

Através desta técnica foi possível determinar a carga alélica do alelo mutado e do alelo normal em cada amostra estudada. A mediana da carga alélica nos 46 pacientes *JAK2V617F* foi 50,8% (variação, 11-100%). Os níveis de *JAK2V617F* variaram de 21% a 100% nos 19 pacientes com PV (mediana, 61,9%), de 36% a 100% nos 8 pacientes com MFP (mediana, 69,8%) e nos 19 pacientes com TE a carga alélica variou de 11% a 59% (mediana, 40,6%) ($p<0,001$) (Figura 13).

Figura 13: Carga alélica de *JAK2V617F* em 46 pacientes com mutação de *JAK2*. Para comparação, resultado de pacientes com PV (n=19), MFP (n=8) e TE (n=19) são apresentados. A carga alélica de *JAK2V617F* nas TE é a mais baixa ($p<0,0001$).

Os pacientes com PV foram divididos em dois grupos; aqueles que apresentaram carga alélica maior do que 50% e aqueles com carga menor ou igual a 50%. Quando comparamos as características clínicas e laboratoriais entre os dois grupos nenhuma diferença foi encontrada (Tabela 4).

Tabela 4. Achados clínicos e laboratoriais de pacientes com PV de acordo com a carga alélica de *JAK2V617F*

PV	<i>JAK2</i> ≤ 50% carga alélica, média (DP)	<i>JAK2</i> > 50% carga alélica, média (DP)	P (valor)
Pacientes	7	12	
Idade (anos)	55,9 (12,2)	67,7 (14,8)	0,12
Sexo			
Masculino	2	7	
Feminino	5	5	0,22
Hemácias (milhões/mm ³)	6,33 (1,35)	6,34 (1,5)	0,59
Hb (g/dL)	16,6 (1,9)	17 (2,8)	0,65
Htc (%)	51 (5,9)	53,7 (6,8)	0,38
Leucócitos (mil/mm ³)	13 (8,2)	11,7 (5,7)	1,00
Plaquetas (mil/mm ³)	582 (223)	518 (211)	0,53

Análise semelhante foi realizada para a MFP e TE onde não houve diferenças estatísticas entre o grupo com carga alélica maior do que 50%, menor ou igual a 50% e os pacientes que não apresentaram mutação *JAK2V617F* (Tabelas 5, 6).

Tabela 5. Achados clínicos e laboratoriais de pacientes com MFP de acordo com a carga alélica de *JAK2V617F*

MFP	<i>JAK2</i> ≤ 50% carga alélica, média (DP)	<i>JAK2</i> > 50% carga alélica, média (DP)	<i>JAK2</i> selvagem média (DP)	P (valor)
Pacientes	2	6	12	
Idade (anos)	51 (31)	67,5 (8,4)	64,7 (14,2)	0,84
Sexo				
Masculino	1	5	6	
Feminino	1	1	6	0,38
Hemácias (milhões/mm ³)	2,61 (0,007)	3,76 (1,32)	3,55 (0,85)	0,45
Hb (g/dL)	7,5 (0,7)	11,5 (2,8)	10,6 (2,3)	0,15
Htc (%)	23 (2,8)	35,1 (9,4)	32,7 (6,8)	0,17
Leucócitos (mil/mm ³)	9,9 (1,4)	21 (22,3)	9,4 (7,2)	0,07
Plaquetas (mil/mm ³)	140 (65)	67,5 (8,4)	513 (468)	0,34

Tabela 6 . Achados clínicos e laboratoriais de pacientes com TE de acordo com a carga alélica de *JAK2V617F*

TE	<i>JAK2</i> ≤ 50% carga alélica, média (DP)	<i>JAK2</i> > 50% carga alélica, média (DP)	<i>JAK2</i> selvagem média (DP)	P (valor)
Pacientes	15	4	9	
Idade (anos)	60 (21,6)	64 (11,4)	53,3 (20,3)	0,61
Sexo				
Masculino	5	0	2	
Feminino	10	4	7	0,38
Hemácias (milhões/mm ³)	4,89 (0,72)	3,99 (0,88)	4,22 (0,94)	0,11
Hb (g/dL)	14 (1,1)	11,5 (2,1)	13,5 (1,8)	0,10
Htc (%)	42,3(3,7)	35,2 (6,2)	39,8 (5,0)	0,08
Leucócitos (mil/mm ³)	11,1 (5,0)	9,1 (3,8)	7,7 (2,1)	0,15
Plaquetas (mil/mm ³)	755 (269)	611 (423)	804 (502)	0,83

5.3 PCR-HRM

Na figura 14, notamos a presença de três genótipos (GG, GT e TT) que podem ser distinguidos utilizando a técnica de HRM. A utilização do marcador KAPPA, que é um intercalante de DNA dupla fita, faz com que ocorra um aumento da fluorescência diretamente proporcional ao aumento do número de cópias de DNA durante a reação de PCR. Subsequentemente o sinal diminui com a transição da fita dupla de DNA para fita simples de DNA e isto ocorre devido ao aumento de temperatura de desnaturação.

O método de PCR-HRM foi realizado de acordo com o item 4.3.3, sua análise (demonstrada na figura 14) pôde detectar a mutação *JAK2V617F* em 95% das amostras com suspeita de PV (19/20), 40% em MFP (8/20), 68% em TE (19/28) e 1% nas suspeitas de NMPs (1/68) (Tabela 7).

Tabela 7: Tabela de resultados das análises do PCR-HRM.

	PCR - HRM		
	<i>JAK2V617F</i>	+	-
			Total
PV	19 (95%)	01 (5%)	20
MFP	08 (40%)	12 (60%)	20
TE	19 (68%)	09 (32%)	28
Suspeitas NMPs	01 (1%)	67 (99%)	68
Total	40(29%)	96 (71%)	136

Figura 14: Visualização da análise de HRM. Na figura A é apresentado a curva de dissociação que mostra a diferença das temperaturas, através dessa diferença é possível identificar os diferentes fenótipos. O fenótipo de *JAK2* selvagem possui uma temperatura de dissociação maior, tendo em vista que na sua sequência alvo existe a ligação de G-C, que por ser mais resistente, demora mais para se dissociar. No *JAK2* mutado (*JAK2V617F*) existe uma troca de um G por um T, logo sua temperatura de dissociação é mais baixa já que a ligação de A-T é mais fácil de ser quebrada. Já nos pacientes com a dupla população, as ligações se tornam instáveis, ocorrendo dissociação em temperaturas diferentes.

5.4. SEQUENCIAMENTO DIRETO

Todas as amostras incluídas nesse estudo foram sequenciadas a fim de verificarmos a presença da mutação *JAK2V617F*. O Sequenciamento das amostras foi realizado pela técnica de Sanger e seguiu o item 4.3.4, a análise foi realizada a partir do eletroferograma (como mostra a figura 14). As amostras foram consideradas positivas ou negativas para a mutação quando um dos

picos (G ou T) no eletroferograma se apresentou maior do que 20%, considerado como o grau de sensibilidade da técnica (Figura 14 A e B). Nos casos de dupla população a porcentagem do pico positivo e negativo era semelhante (Figura 14.C). Analisando as amostras estudadas encontramos a mutação *JAK2*V617F em 85%, 40%, 61% e 4% nas amostras com suspeita de PV, MFP, TE e NMP respectivamente (Tabela 8).

Figura 15: Eletroferograma das amostras. A: corresponde a um paciente com *JAK2* selvagem: Paciente com a presença da mutação V617F e C: paciente com ambas as populações, selvagem e mutada.

Tabela 8: Tabela de resultados das análises de Sequenciamento Direto.

Sequenciamento Direto			
<i>JAK2V617F</i>	+	-	Total
PV		01 (05%)	20
MFP		12 (60%)	20
TE		10 (36%)	28
Suspeitas NMPs		65 (95%)	68
Total		90 (66%)	136

5.5. ANÁLISE COMPARATIVA DAS DIFERENTES METODOLOGIAS

A técnica do PCR-RFLP foi escolhida como metodologia padrão neste estudo devido esta ser a técnica mais utilizada na identificação da mutação *JAK2V617F* e isto ocorre por ser simples e com baixo custo. Quando comparado os resultados obtidos pelas técnicas PCR-ARMS, PCR-HRM e o Sequenciamento direto pela técnica de Sanger em pacientes com PV foi observado que a frequência de amostras mutadas (95%) foi igual a encontrada na técnica de PCR-RFLP (Tabela 9). O único paciente com PV negativo para a mutação *JAK2V617F* também foi negativo pelas outras três técnicas estudadas.

Nos pacientes com MFP houve novamente concordância de casos positivos entre as técnicas PCR-ARMS, PCR-HRM e o Sequenciamento direto com o PCR-RFLP, onde foi encontrado 40% de positividade para a mutação *JAK2V617F*. A metodologia PCR-RFLP identificou um paciente positivo para a mutação, o que não ocorreu com a utilização das outras três técnicas (Fisher Exact Test; $p=0,001$) e o inverso também foi observado em outro paciente onde a mutação não foi detectada pela técnica de PCR-RFLP e identificada pelas outras três técnicas (Fisher Exact Test; $p=0,001$).

Nos pacientes com diagnóstico de TE houve grande discordância entre as diferentes técnicas mostrando que a técnica do PCR-RFLP foi a que identificou o maior número de mutações, 20 em 28 pacientes (71%) enquanto as técnicas de PCR-ARMS, PCR-HRM e o Sequenciamento direto identificaram 19, 19 e 18 pacientes positivos respectivamente (Tabela 9). Novamente a PCR-RFLP identificou um paciente positivo para a mutação enquanto este mesmo paciente foi negativo para a técnica de PCR-ARMS (Fisher Exact Test; $p<0,0001$). Os mesmos achados foram vistos nas técnicas de PCR-HRM e Sequenciamento onde houve o encontro de dois e três pacientes negativos para a mutação respectivamente (Fisher Exact Test; $p<0,0001$).

Nas 68 amostras que foram encaminhadas ao laboratório com a suspeita de mieloproliferação a metodologia PCR-RFLP identificou um paciente a mais que a técnica de PCR-ARMS e o Sequenciamento direto (Fisher Exact Test; $p=0,001$) e dois a mais que a técnica PCR-HRM (Fisher Exact Test; $p=0,001$) (Tabela 9).

Tabela 9: Frequência de positividade de *JAK2V617F* através das diferentes técnicas nas NMPs.

		PCR-RFLP	PCR-ARMS	PCR-HRM	Sequenciamento Direto
	N	JAK2V617F POSITIVO			
PV	20	19 (95%)	19 (95%)	19 (95%)	19(95%)
MFP	20	08 (40%)	08 (40%)	08 (40%)	08 (40%)
TE	28	20 (71%)	19 (68%)	19 (68%)	18 (64%)
Suspeitas NMPs	68	03 (4%)	02 (3%)	01 (1%)	02 (3%)

6. DISCUSSÃO

As Neoplasias mieloproliferativas (NMP) se originam por proliferação clonal de células tronco hematopoiéticas, levando à hematopoiese exacerbada com expansão de uma ou mais linhagens celulares na medula óssea. As manifestações clínicas são decorrentes do aumento do número de células de linhagem hematopoiética na medula óssea ou em sítios extramedulares.

As NMPs *BCR-ABL1* negativo não apresentavam uma alteração genética conhecida até 2005 quando foi identificada a mutação *JAK2V617F* que ocorria em mais de 90% das PV e em metade das MFP e TE (James et al. 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005; Baxter et al., 2005).

A identificação dessa mutação começou então a ter um papel importante, sendo considerada um dos principais critérios diagnósticos para as NMP (Zhang et al 2015). As metodologias para detecção desta mutação foram ampliadas além da técnica do sequenciamento direto reportado inicialmente em 2005 (James et al. 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005; Baxter et al., 2005).

Desde os primeiros estudos onde a mutação *JAK2V617F* nas NMPs foi identificada, várias outras metodologias já foram descritas, como a PCR-RFLP, que vem sendo utilizada em vários laboratórios clínicos comerciais ou em laboratórios de instituições acadêmicas e isto ocorre devido ao grande atrativo desta técnica que é a existência de vários kits manufaturados tendo como princípio essa técnica, devido também ao baixo custo e o mais importante, a não necessidade de instrumentos precisos e de custo elevado para a análise dos resultados. Como toda técnica, a PCR-RFLP apresenta também alguns problemas como: a baixa sensibilidade (5-10%) (Campbell et al., 2005; Frantz et al., 2007; Cankovic et al. 2009), a análise ser subjetiva, a utilização de uma enzima de restrição, que requer condições ideais para a sua atividade caso contrário a interpretação dos resultados pode sugerir falsos positivos e por final, o tempo de execução de toda a metodologia. Devido esta técnica ser a mais utilizada, optamos neste estudo, comparar os resultados obtidos por ela com outras metodologias também já descritas, como o PCR-ARMS, PCR-HRM

e o Sequenciamento direto pela técnica de Sanger, sendo esta última considerada como o padrão ouro na identificação da mutação *JAK2V617F* (James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al. 2005; Baxter et al., 2005).

Os métodos PCR-ARMS e PCR-HRM têm suas vantagens, como a sensibilidade de 0,1 a 5% e 1 a 5% respectivamente e o tempo de execução, mas também há limitações como a instrumentação de alto custo (Baxter et al., 2005; Chen et al., 2007; Tan et al., 2007; Rapado et al., 2009; Qian et al., 2010).

No caso do Sequenciamento direto pela técnica de Sanger a sensibilidade é entorno de 20%, todavia a identificação da troca da base nitrogenada timina por uma guanina não deixa nenhuma dúvida quanto a presença da mutação, por isso é considerada por muitos como padrão ouro (Lippert et al. 2009; Bench et al., 2013).

Quando comparamos os resultados das quatro técnicas empregadas nos pacientes com suspeita de PV, notamos que houve uma concordância de 100% na identificação da mutação *JAK2V617F* em 19 dos 20 pacientes (95%) o que é condizente com a literatura (McClure et al., 2006). Isto demonstra que independente da sensibilidade de cada uma das metodologias empregadas, foram encontrados os mesmos resultados. No único paciente que não foi caracterizada a mutação *JAK2V617F*, foi identificada a mutação no exon 12 (K539L), que pode ocorrer em até 27% dos casos de eritrocitose idiopática (Percy et al., 2007).

Os mesmos achados foram encontrados nas MFP, onde 40% dos pacientes portadores desta patologia apresentaram mutação *JAK2V617F* identificada pelas quatro técnicas.

Os resultados discordantes foram evidenciados nos grupos de pacientes com TE e em amostras com suspeita de NMP. Quando comparamos a técnica de PCR-RFLP, PCR-HRM e PCR-ARMS em amostras de TE notamos que houve discordância em somente uma amostra das 28 estudadas, 20/28, 19/28 e 19/28 respectivamente. Esta discordância foi devido à digestão parcial na amostra que foi considerada positiva com a técnica PCR-RFLP. A metodologia de Sequenciamento direto identificou a mutação *JAK2V617F* em 18 (64%)

pacientes contra 20 (71%) observados pela técnica de PCR-RFLP. Dentre as duas amostras discordantes entre as técnicas mencionadas acima, uma delas foi a mesma descrita anteriormente onde houve a digestão parcial. No caso da outra amostra discordante entre as técnicas mencionadas acima foi decorrente do baixo pico (8%) da amostra no Sequenciamento direto que foi considerada negativa devido ao grau de sensibilidade desta técnica que é de 20% (Figura 16).

Figura 16: A: Apresenta o eletroferograma da amostra discordante, no sequenciamento ela foi considerada ausente de mutação. Nota-se, porém, uma pequena linha marcando a presença de um T no local marcado em vermelho, que poderia ser observada como um ruído da reação. B: O Software possui uma ferramenta que permite solicitar a porcentagem de cada alelo. Nesse informativo o software avaliou o pequeno pico de T e calculou uma porcentagem de 8% de alelo mutado. Como a sensibilidade do teste é 20% o software não acusou a presença da mutação de *JAK2V617F* nessa amostra.

Devido o laboratório realizar a pesquisa de mutação do gene *JAK2V617F* de forma rotineira é frequente a solicitação desta mutação em pacientes com suspeita de NMP. Das 68 amostras com esta suspeita foram identificadas três amostras positivas pela técnica PCR-RFLP onde uma delas não foi confirmada pelas três outras metodologias. A razão desta discordância já foi discutida anteriormente. Dentre as duas outras amostras positivas, uma só foi discordante na técnica de PCR-HRM e positiva para as outras duas

metodologias, PCR-ARMS e Sequenciamento direto. A hipótese para este resultado pode ser interpretado pela baixa qualidade do DNA que poderia ter interferido na reação de PCR-HRM (Figura 17).

Figura 17: A Figura apresenta a análise do PCR-HRM, nota-se que a amostra com resultado discordante não apresenta o mesmo perfil de curva como as outras amostras. O ensaio foi repetido, porém a amostra se manteve com a curva semelhante. Essa diferença na análise pode ter ocorrido devido a uma baixa qualidade da amostra de DNA, essa qualidade é extremamente necessária na PCR-HRM. K562: Controle Selvagem, SEL: amostra selvagem, HEL: controle positivo, 2P: Amostra com duas populações de *JAK2*.

Os dados apresentados no presente estudo podem sugerir que a despeito da metodologia do PCR-RFLP apresentar relativa sensibilidade à detecção da mutação *JAK2*V617F, esta técnica apresenta falhas durante o seu processo como também durante a análise final dos resultados.

No decorrer da metodologia a digestão enzimática do fragmento de DNA é essencial para a análise final do exame (Lay et al.,2006). Quando a digestão é parcial notamos a presença de dois fragmentos: um seria o fragmento digerido pela enzima específica que ocorre somente nos casos onde não há mutação (180pb) e o outro fragmento que sofreu a digestão parcial, que se assemelha ao fragmento mutado (360pb). Outra crítica ao teste é a subjetividade da análise do resultado, pois os analistas podem interpretar a leitura do gel de agarose de formas diferentes, já que a integridade e o brilho

adicionados à imagem durante a sua captura no fotodocumentador podem influenciar na visualização dos fragmentos obtidos e consequentemente nos resultados finais, podendo assim, criar falsos positivos (Shepard et al., 2010). Além disso, essa técnica, juntamente com o Sequenciamento direto, apresenta maior complexidade e são consideradas mais laboriosas. A preparação do produto de PCR para a próxima fase, como digestão pela enzima na técnica de PCR-RFLP e a purificação do DNA para o Sequenciamento direto, consomem tempo exigindo maior trabalho/hora por exame (Kannim et al., 2009).

Técnicas como PCR-ARMS e PCR-HRM são mais rápidas, pois independem de digestões ou purificações e desta forma aumentam a produtividade do laboratório com menor trabalho/hora por exame. Deve-se também levar em conta que estas duas técnicas e o Sequenciamento direto necessitam de maquinário sofisticado e de custo elevado para a realização dos exames o que não é necessário na metodologia PCR-RFLP.

Outro fator importante que devemos levar em conta é a manipulação das amostras. Na técnica de PCR-RFLP e de Sequenciamento Direto as amostras são manipuladas demasiadamente o que aumenta a taxa de contaminação cruzada, por outro lado, nas técnicas de PCR-HRM e PCR-ARMS a reação é realizada somente em um tubo no qual a amostra e os reagentes são colocados e levados para um termociclador, que no caso da PCR-HRM tem a capacidade de detectar a emissão de fluorescência no decorrer da dissociação das fitas de DNA. O resultado desta técnica pode ser analisado ao final da reação no próprio termociclador. A metodologia de PCR-ARMS, por sua vez, necessita de um termociclador comum e ao término da reação de PCR as amostras submetidas à eletroforese capilar ou em gel de agarose a 3% (Er et al., 2009), onde ocorrerá a separação dos fragmentos mutados e normais.

Recentemente, alguns estudos reportaram a importância da carga alélica de *JAK2V617F* nas NMPs (Borowczyk et al., 2015; Yonal-Hindilerden et al., 2015). Antonioli e cols. reportaram que a carga alélica pode estar ligada aos diferentes fenótipos nas NMP, onde as cargas mais altas estariam presentes nas Mielofibroses (MF) pós-PV ou pós-TE, as baixas nas TE e as cargas alélicas intermediárias na PV ou na MFP (Antonioli et al, 2008).

Os achados quanto à carga alélica do presente estudo mostraram que os pacientes com MFP apresentaram a maior carga alélica (mediana, 69,8%) seguida pelos pacientes com PV (mediana, 61,9%) e a carga alélica mais baixa encontrada na TE (mediana 40,6%). Os nossos resultados estão de acordo com os dados publicados por Edahiro e cols. que conduziram um estudo no Japão com pacientes diagnosticados com NMP e encontraram carga alélica de *JAK2V617F* maior na PV seguida pela MFP e tendo a TE a carga alélica mais baixa (71,7%, 60,8% e 35,5% respectivamente) (Edahiro et al., 2014). A mesma afirmação pode-se concluir quando o presente estudo se compara ao estudo feito na Turquia, onde os pacientes com MFP apresentaram carga alélica maior do que aqueles com TE (23,4% e 4,7% respectivamente) (Yonal-Hindilerden et al., 2015). Neste mesmo estudo não foram analisados pacientes com PV.

Em conclusão, as quatro metodologias utilizadas no presente estudo se mostraram adequadas na detecção da mutação *JAK2V617F*, sendo a PCR-RFLP a que apresentou dois casos de falsos positivos o que não inviabilizou o diagnóstico e o acompanhamento destes pacientes. A técnica de Sequenciamento direto, apesar de ser considerada como padrão ouro em muitas outras análises genéticas, é trabalhosa e consome muito tempo do laboratório, além de necessitar um sequenciador automático, que ainda tem um custo muito alto, o que inviabiliza a escolha desta metodologia. Desta forma as técnicas de PCR-HRM e PCR-ARMS demonstraram serem eficientes no quesito tempo de processamento, menor possibilidade de contaminação cruzada e menor custo quanto ao trabalho/hora. É importante lembrar que em nosso estudo obtivemos diferença entre a técnica de PCR-HRM e PCR-ARMS onde na primeira não foi detectada a mutação *JAK2V617F*, decorrente da qualidade do DNA, o que não interferiu na técnica de PCR-ARMS.

Desta forma o presente estudo sugere que a técnica de PCR-ARMS deve ser a metodologia de escolha para a determinação da mutação *JAK2V617F*, esta já está sendo empregada no Laboratório de Biologia Tumoral da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

7. CONCLUSÕES

- Em comparação com a PCR-RFLP, que é a técnica mais comumente utilizada em laboratórios, pode-se afirmar que todas as técnicas (PCR-ARMS, PCR-HRM e Sequenciamento direto) são eficazes para a detecção da mutação de *JAK2*V617F.
- O presente trabalho conclui que a técnica de PCR-ARMS se mostrou superior a outras metodologias empregadas por apresentar menor manuseio das amostras, tempo de elaboração e a capacidade de determinar a carga do alelo mutado e do alelo selvagem de *JAK2*, algo de extrema importância no acompanhamento dos pacientes com diagnóstico de NMPs submetidos ao tratamento com inibidores de *JAK*.

8. REFERÊNCIAS¹

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York (NY): Garland Science; 2008.

Antonioli, E Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of *JAK2*V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008;93(1):41-8.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054-61.

Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard AL, Akiki S, et al. Molecular diagnosis of the Myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of *JAK2* V617f and other relevant mutations. *Br J Hematol*. 2013;160(1):25-34.

Borowczyk M, Wojtaszewska M, Lewandowski K, Gil L, Lewandowska M, Lehmann-Kopydlowska A, et al. The *JAK2*V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasm. *Thromb Res*. 2015;135:272-80.

Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on *JAK2* V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1945-53.

Cankovic M, Whiteley L, Hawley RC, Zarbo RJ, Chitale D. Clinical performance of *JAK2* V617F mutation detection assays in a molecular diagnostics laboratory: evaluation of screening and quantitation methods. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(5):73-21.

Cao HC, Lin J, Qian J, Yao DM, Li Y, Yang J, et al. Detection of the *JAK2* mutation in myeloproliferative neoplasms by asymmetric PCR with unlabeled probe and high-resolution melt analysis. *J Clin Lab Anal*. 2011;25(4):300-4.

Chauffaille MLLF. Neoplasias mioleproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(4):308-16.

Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of *JAK2* V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn.* 2007;9(2):272-6.

Edahiro Y, Morishita S, Takahashi K, Hironaka Y, Yahata Y, Sunami Y, et al. *JAK2*v617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasm in Japan. *Int J Hematol.* 2014;99:625-34.

Er TK, Lin SF, Chang JG, Hsieh LL, Lin SK, Wang LH, et al. Detection of the *JAK2* V617F missense mutation by high resolution melting analysis and its validation. *Clin Chim Acta.* 2009;408(1-2):39-44.

Frantz C, Sekora DM, Henley DC, Huang CK, Pan Q, Quigley NB, et al. Comparative evaluation of three *JAK2*V617F mutation detection methods. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(5):865-74.

Ho CL, Wu YY, Hung HM, Chang PY, Kao WY, Chen YC, et al. Rapid identification of heterozygous or homozygous *JAK2*(V617F) mutations in myeloproliferative neoplasms using melting curve analysis. *J Formos Med Assoc.* 2012;111(1):34-40.

Hoffman R, Furie B, J. BE, Philip M, E. SL, Shattil SJ. *Hematology basic principles and practice.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier; 2008.

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

Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the *JAK2* V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2005;106(6):2162-8.

Kannim S, Thongnoppakhun W, Auewarakul C. Two-round allele specific-polymerase chain reaction: a simple and highly sensitive method for *JAK2*V617F mutation detection. *Clin Chim Acta*. 2009;401(1-2):148-51.

Kapoor G, Correa H, Yu LC. Essential thrombocythemia in an infant. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1996;18(4):381-3.

Kiladjian JJ. The spectrum of *JAK2*-positive myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:561-6.

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):1779-90.

Lay M, Mariappan R, Gotlib J, Dietz L, Sebastian S, Schrijver I, et al. Detection of the *JAK2* V617F mutation by LightCycler PCR and probe dissociation analysis. *J Mol Diagn*. 2006;8(3):330-4.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York (NY): Freeman & Co. Publishers; 2004.

Leite AB, Silva HF, Nogueira OL. Trombocitemia essencial. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2001;23:49-50.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-97.

Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;112(6):2190-8.

Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of *JAK2* in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):673-83.

Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;233-9, 510.

Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(9):651-62.

Lippert E, Girodon F, Hammond E, Jelinek J, Reading NS, Fehse B, et al. Concordance of assays designed for the quantification of JAK2V617F: a multicenter study. *Haematologica*. 2009;94:38-45.

Lippert E, Boissinot M, Kralovics, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006;108(6):1865-7.

Macdonald D, Cross NC. Chronic myeloproliferative disorders: the role of tyrosine kinases in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Pathobiology*. 2007;74(2):81-8.

McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006;20(1):168-71.

Monte-Mór BCR, Costa FF. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(3):241-8.

Ono A, Okuhashi Y, Takahashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Advantages of the quenching probe method over other PCR-based methods for detection of the JAK2 V617F mutation. *Oncol Lett*. 2012;4(2):205-8.

Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Panu M, et al. JAK2 p. mutation - tetra-primer PCR and PCR-RFLP comparative semiquantitative approaches for estimation of the mutant allele in myeloproliferative neoplasm. *Rev Română Med Laborator*. 2009; 14(1):25-30.

Paradis FW, Simard R, Gaudet D. Quantitative assay for the detection of the V617F variant in the Janus kinase 2 (JAK2) gene using the Luminex xMAP technology. *BMC Med Genet*. 2010;11:54.

Passamonti F, Maffioli M, Caramazza D, Cazzola M. Myeloproliferative

neoplasms: from *JAK2* mutations discovery to *JAK2* inhibitor therapies. *Oncotarget*. 2011;2(6):485-90.

Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, et al. The frequency of *JAK2* exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica*. 2007;92(12):1607-14.

Qian L, Lin J, Yao DM, Chen Q, Xiao GF, Ji RB, Li Y, et al. Rapid detection of *JAK2* V617F mutation using high-resolution melting analysis with LightScanner platform. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):2097-100.

Rapado I, Grande S, Albizua E, Ayala R, Hernández JA, Gallardo M, et al. High resolution melting analysis for *JAK2* Exon 14 and Exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn*. 2009;11(2):155-61.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The *JAK/STAT* signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 8):1281-3.

Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Eddins S, et al. The V617F *JAK2* mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106(8):2920-1.

Shepard GC, Lawson HL, Hawkins GA, Owen J. BsaXI/RFLP analysis of initial or selectively reamplified PCR product is unreliable in detecting the V617F mutation in *JAK2*. *Int J Lab Hematol*. 2010;33(3):267-71.

Spivak JL. Narrative review: Thrombocytosis, polycythemia vera, and *JAK2* mutations: the phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation. *Ann Intern Med*. 2010;152(5):300-6.

Swerdlow SH, Campos E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *WHO classification of tumours*. 4th ed. Lyon: IARC; 2008.

Tan AY, Westerman DA, Dobrovic A. A simple, rapid, and sensitive method for the detection of the *JAK2* V617F mutation. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(6):977-81.

Type-it HRM PCR Handbook. For detection of gene mutations and SNPs by high-resolution melting (HRM) analysis. July 2009. Qiagen. Available from: <https://www.qiagen.com/fr/shop/assay-technologies/type-it-hrm-pcr-kit/#resources>.

Vainchenker W, Constantinescu SN. A unique activating mutation in *JAK2* (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:195-200.

Vakil E, Tefferi A. *BCR-ABL1*--negative myeloproliferative neoplasms: a review of molecular biology, diagnosis, and treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(Suppl 1):S37-45.

Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Guglielmelli P. A quantitative assay for *JAK2*(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. *Leukemia*. 2006;20(6):1055-60.

Won HH, Park I, Lee E, Kim JW, Lee D. Comparative analysis of the *JAK/STAT* signaling through erythropoietin receptor and thrombopoietin receptor using a systems approach. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(Suppl 1):S53.

Yonal-Hindilerden I, Daglar-Aday A, Akadam-Teker B, Yilmaz C, Nalcaci M Yavuz AS, et al. The Burden of *JAK2*V617F mutated allele in Turkish patients with myeloproliferative neoplasm. *J Clin Med Res*. 2015;7(3):161-170.

Zhang SP, Li H, Lai RS. Detection of *JAK2* V617F mutation increases the diagnosis of myeloproliferative neoplasm. *Oncology Lett*. 2015;9(2):735-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver