

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VARIANTES NO GENE *JAK2* EM**  
**PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS**  
***BCR/ABL1* NEGATIVO**

**DANIA ISAMARY GUTIÉRREZ TORRES**

**MANAUS**

**2022**

**DANIA ISAMARY GUTIÉRREZ TORRES**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VARIANTES NO GENE *JAK2* EM  
PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS  
*BCR/ABL1* NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Monteiro Tarragô.

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucivana de Souza Mourão.

**MANAUS**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

T693cc Torres, Dania Isamary Gutiérrez  
Caracterização molecular de variantes no gene JAK2 em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR/ABL1 negativo / Dania Isamary Gutiérrez Torres. Manaus : [s.n.], 2022.  
156 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Programa de pós-graduação em ciências aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia



Orientador: Andréa Monteiro Tarragô

Coorientador: Lucivana P. de Souza Mourão

1. Janus quinase 2. Neoplasias mieloproliferativas crônicas. 3. Sinalização intracelular. 4. Região codificante. 5. Sequenciamento de Sanger. I. Andréa Monteiro Tarragô (Orient.). II. Lucivana P. de Souza Mourão (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Caracterização molecular de variantes no gene JAK2 em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR/ABL1 negativo

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 01/2022**

Aos vinte dias do mês de maio do ano de 2022, às 09h00, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação de Mestrado da discente **Dania Isamary Gutiérrez Torres**, sob o título "**Caracterização molecular de variantes no gene JAK2 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR/ABL1 negativo**", tendo como orientadora o Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô e coorientadora a Profa. Dra. Lucivana P. de Souza Mourão segundo encaminhamento da Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Profa. Dra. Leny Nascimento da Motta Passos Presidente (HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ( )	 Assinatura: <small>Profa. Dra. Leny Passos</small> CPF: 034842462-00
Profa. Dra. Aya Sadahiro – Membro (UFAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ( )	 Assinatura: CPF: 128412458-45
Profa. Dra. Katia Luz Torres – Membro (CECON)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ( )	 Assinatura: CPF: 413175302-25

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

( x ) Aprovado

( ) Não Aprovado

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca Examinadora

## DEDICATÓRIA

Dedico este estudo:

A Deus, por ser meu maior exemplo de humildade e de sabedoria,

Aos meus pais, Ada Luz Torres Cardoza e Rafael Antonio Gutiérrez Montoya, por serem meus maiores exemplos de crescimento espiritual e moral,

A minha irmã, Odeth Saraí Gutiérrez Torres por ser um dos meus principais pilares de força durante este caminhar,

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Monteiro Tarragô, Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucivana de Prata Souza Mourão e Prof. Dr. George Allan Villarouco por serem pessoas de inspiração no meu crescimento profissional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por dar-me a vida, sabedoria, força e sobretudo por estar comigo sempre, porque junto com Nossa Senhora demonstraram-me sua misericórdia neste longo caminhar.

Aos meus pais, Ada Luz Torres Cardoza e Rafael Antonio Gutiérrez Montoya, por amar-me, aconselhar-me e sempre apoiar-me em meus projetos pessoais. Vocês são meu motor!

A minha irmã, Odeth Saraí Gutiérrez Torres, por compartilhar-me sempre seu amor, cuidar-me e ser minha amiga em todo momento. Eu te amo!

A minhas tias Mónica e Elieta, e meus primos Jannery, Gustavo e Betzy, porque apesar da distância sempre estiveram comigo, dando-me inclusive palavras de alento em meus momentos mais críticos.

Aos meus familiares e amigos na Nicarágua, por apoiar-me em meus projetos, incentivar-me a ser uma melhor pessoa cada dia e acreditar em mim.

A sra. Maria de Fátima M. Silva, por sua confiança, amor e compreensão durante minhas jornadas de estudo e por cuidar-me sempre como uma mãe.

À família Monteiro Tarragô, por compartilhar comigo momentos especiais e fazer-me sentir um membro mais da família. Imensamente grata pelo carinho transmitido em todo este tempo. Vocês também agora são minha família.

A minha orientadora, Dra. Andréa Monteiro Tarragô, por confiar em mim, por transmitir-me grandes conhecimentos, guiar-me pelos bons caminhos e incentivar-me sempre a dar minha melhor versão tanto no âmbito profissional como humano. Pela paciência, amizade e confiança depositada em todo este tempo. Gratidão é uma palavra extremamente curta para expressar quão eu sinto por você!

A minha coorientadora, Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão, pelos ensinamentos brindados que também foram essenciais no meu mestrado. Por sua amizade e conselhos, que com certeza, contribuirão no meu crescimento acadêmico.

Ao Dr. George Allan Villarouco, por ser uma pessoa que contribuiu excepcionalmente na realização deste estudo. Pelos conselhos e assessoria brindada durante a execução da investigação. Obrigada por acreditar em mim.

A Wanessa Horreda, por dar-me sua amizade, confiança e apoio; sentimentos que cresceram durante nossas caminhadas no LabGen. Obrigada pela disposição em ajudar-me sempre.

Aos meus colegas do mestrado, especialmente a Gláucia, Marielle, Ana e Augusto por sua linda amizade e apoio sempre. Obrigada pelos tão bons momentos que compartilhamos, pelas risadas e apoio mútuo em momentos de desespero.

Aos membros da equipe de Neoplasias mieloproliferativas, Emanuela, Miliane, Jhemerson, Déborah e Éricka, por sua disposição e dedicação na execução do projeto.

Ao Pessoal do LabGen, especialmente a Dra. Nadja, Dra. Luciana, Dra. Rafaella, MSc. Rechfy e Robson por assistir-me sempre que precisei, pelo apoio técnico oferecido durante minhas jornadas experimentais.

Ao pessoal da recepção do Laboratório Clínico da Fundação HEMOAM, especialmente a Thaila, Marcia e Stephanie, por ajudar com disposição na captação de pacientes. Obrigada, vocês foram parte importante para a execução desta pesquisa.

Aos colaboradores do SAME e enfermagem, especialmente Alexandre, Soraya, Neida e Leonice por ajudar na logística do estudo, especialmente na busca de pacientes e prontuários médicos.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), por converter-se na instituição que me ajudou a construir o perfil profissional que até hoje eu demonstro. Por ser o lugar que me ensinou a recompensa que traz o sacrifício.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de formar parte do programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e contribuir a que pessoas com ideais de superação conquistem sonhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e apoio financeiro para realização dos meus estudos de mestrado e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.



## **DECLARAÇÃO DE AGENCIAS FINANCIADORAS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização dos meus estudos de mestrado e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

**Introdução:** As neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo são doenças clonais causadas pela proliferação aberrante de células hematopoiéticas na medula óssea e acumulação excessiva de elementos sanguíneos maduros no sangue periférico. Policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária constituem as entidades mais clássicas dentro desta classificação de doenças hematológicas, as quais têm em comum rearranjos genéticos em uma das principais vias de sinalização intracelular: a via JAK2/STAT5. O gene *JAK2* codifica a proteína Janus quinase 2 (JAK2), envolvida em processos de proliferação e diferenciação celular. *JAK2V617F* é a variante mais frequente e de maior estudo neste grupo de doenças pela habilidade de gerar diversos fenótipos clínicos. Variantes no éxon 12 do gene *JAK2* pesquisam-se em indivíduos *JAK2V617F* negativos, compreendendo aproximadamente 3% dos casos. Embora *JAK2V617F* e variantes no éxon 12 de *JAK2* constituam os principais alvos de pesquisa nas Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo, novas variantes em toda a extensão do gene têm sido identificadas. **Objetivo:** O estudo visou caracterizar molecularmente variantes no gene *JAK2* em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR/ABL1* negativo: Policitemia vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose. **Metodologia:** Foram avaliados 75 pacientes com diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas *BCR/ABL1* negativo: Policitemia vera, Trombocitemia essencial e Mielofibrose. Dados clínicos obtiveram-se de prontuários médicos. Dados laboratoriais obtiveram-se de coletas de amostras durante o seguimento dos indivíduos. Realizou-se avaliação molecular mediante Reação em cadeia de Polimerase convencional e Sequenciamento de Sanger para detecção de variantes na região codificante do gene *JAK2*. Análise estatística de variáveis categóricas foi realizada pelo teste Qui-Quadrado. Os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para análise de variáveis numéricas, quando for conveniente. Valores de  $p < 0.05$  consideraram-se estatisticamente significativos. **Resultados:** Sequenciamento de Sanger demonstrou a presença de *rs907414891*, *rs2230722*, *rs2230723*, *rs10119726*, *rs576746768*, *rs77375493* (*JAK2V617F*), *rs2230728*, *rs2230724*, *rs41316003* e *rs55930140* na região codificante do gene *JAK2*, considerando *rs77375493* a variante mais frequente em indivíduos com Policitemia vera. Coexistência de variantes detectou-se na policitemia vera e na trombocitemia, sendo a combinação de variantes *rs2230722/ rs77375493 /rs2230724* a mais predominante em ambas doenças hematológicas com evidência de alterações em parâmetros hematológicos. **Conclusões:** indivíduos com Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo com as variantes *rs2230724*, *rs2230722* e *rs77375493* tanto separada como conjuntamente evidenciam alterações discretas no perfil clínico-laboratorial, especialmente em concomitância com a variante *rs77375493*, demonstrando envolvimento na instabilidade de mecanismos regulatórios em nível proteico e possivelmente no fenótipo mieloproliferativo.

**Palavras chaves:** Janus quinase 2, Neoplasias Mieloproliferativas crônicas, Sinalização intracelular, Região codificante, Sequenciamento de Sanger.

## ABSTRACT

**Introduction:** *BCR/ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms are clonal diseases caused by aberrant proliferation of hematopoietic cells in the bone marrow and excessive accumulation of mature blood elements in peripheral blood. Polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis are the most classic entities within this classification of hematological diseases, which have in common genetic rearrangements in one of the main intracellular signaling pathways: the JAK2/STAT5 pathway. The *JAK2* gene encodes the Janus kinase 2 (JAK2) protein, involved in cell proliferation and differentiation processes. *JAK2V617F* is the most frequent and most studied variant in this group of diseases due to its ability to generate several clinical phenotypes. Variants on exon 12 of the *JAK2* gene are screened in *JAK2V617F* negative individuals, comprising approximately 3% of cases. Although *JAK2V617F* and *JAK2* exon 12 variants are the main research targets in *BCR/ABL1* negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms, new variants throughout the gene have been identified. **Objective:** The study aimed to molecularly characterize variants in the *JAK2* gene in patients with *BCR/ABL1* negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms: Polycythemia vera, Essential Thrombocythemia and Myelofibrosis. **Methodology:** We evaluated 75 patients diagnosed with *BCR/ABL1* negative myeloproliferative neoplasms: Polycythemia vera, Essential Thrombocythemia and Myelofibrosis. Clinical data were obtained from medical records. Laboratory data were obtained from sample collections during the follow-up of subjects. Molecular evaluation was performed using conventional Polymerase Chain Reaction and Sanger Sequencing to detect variants in the coding region of the *JAK2* gene. Statistical analysis of categorical variables was performed using the Chi-Square test. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to analyze numerical variables, when convenient.  $p < 0.05$  values were considered statistically significant. **Results:** Sanger sequencing demonstrated the presence of *rs907414891*, *rs2230722*, *rs2230723*, *rs10119726*, *rs576746768*, *rs77375493* (*JAK2V617F*), *rs2230728*, *rs2230724*, *rs41316003* and *rs55930140* in the coding region of the *JAK2* gene, considering *rs77375493* the most frequent variant in individuals with Polycythemia vera. Coexistence of variants was detected in Polycythemia vera and Thrombocythemia, with the combination of variants *rs2230722/rs77375493/rs2230724* being the most predominant in both hematological diseases with evidence of alterations in hematological parameters. **Conclusions:** Individuals with *BCR/ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms with the *rs2230724*, *rs2230722* and *rs77375493* variants both separately and together show slight alterations in the clinical-laboratory profile, especially in concomitance with the *rs77375493* variant, demonstrating involvement in the instability of regulatory mechanisms at the protein level and possibly the myeloproliferative phenotype.

**Keywords:** Janus kinase 2, myeloproliferative chronic Neoplasms, Intracellular Signaling, Coding region, Sanger Sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vias de Sinalização envolvidas nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas.....	13
<b>Figura 2.</b> Estrutura gênica e proteica de JAK2.....	15
<b>Figura 3.</b> Interação intramolecular entre os domínios da proteína JAK2.....	17
<b>Figura 4.</b> Desenvolvimento de imunotrombose nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas. .....	20
<b>CAPÍTULO I: JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms</b>	
<b>Figura 1.</b> Timeline of myeloproliferative neoplasms. ....	37
<b>Figura 2.</b> Driver mutations in <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> and <i>CALR</i> genes associated with chronic myeloproliferative neoplasms (MPN). ....	41
<b>Figura 3.</b> JAK/STAT signaling pathways. ....	42
<b>Figura 4.</b> Characterization of the 46/1 haplotype without <i>JAK2</i> gene. ....	44
<b>Figura 5.</b> Immunothrombosis involves the participation of hematopoietic cells and immune system cells.....	46
<b>CAPÍTULO II: Panorama molecular de JAK2 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas do Estado do Amazonas</b>	
<b>Figura 1.</b> Estrutura do gene <i>JAK2</i> .....	85

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes.....	74
<b>Tabela 2.</b> Frequência e distribuição de variantes em pacientes.....	77
<b>Tabela 3.</b> Perfil laboratorial de indivíduos com Policitemia vera com variantes no gene <i>JAK2</i> . .....	80
<b>Tabela 4.</b> Perfil laboratorial de indivíduos com Trombocitemia essencial variantes no gene <i>JAK2</i> . .....	81

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Critérios diagnósticos da Policitemia vera; OMS, 2016.....	5
<b>Quadro 2.</b> Critérios diagnósticos da Trombocitemia Essencial; OMS, 2016.....	7
<b>Quadro 3.</b> Critérios diagnósticos da Mielofibrose/fase pré-Fibrótica; OMS, 2016.....	10
<b>Quadro 4.</b> Critérios diagnósticos da Mielofibrose/fase Fibrótica; OMS, 2016.....	11
<b>Quadro 5.</b> Transcritos de <i>JAK2</i> , Segundo Centro Nacional para a Informação Biotecnológica (NCBI).....	14
<b>Quadro 6.</b> Iniciadores usados na reação em cadeia da polimerase.....	29
<b>Quadro 7.</b> Programações de ciclagens para amplificação de fragmentos.....	31
<b>Quadro 8.</b> Iniciadores utilizados na Reação de Sequenciamento, para detecção de variantes na região codificante de <i>JAK2</i> .....	32
<b>CAPÍTULO I: <i>JAK2</i> Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms</b>	
<b>Quadro 1.</b> Diagnosis criteria for classic <i>BCR/ABL1</i> negative chronic myeloproliferative neoplasms.....	38
<b>CAPÍTULO II: Panorama molecular de <i>JAK2</i> em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas do Estado do Amazonas</b>	
<b>Quadro 1.</b> Variantes detectadas por Sequenciamento de Sanger na região codificante de <i>JAK2</i> em pacientes com NMP.....	76
<b>Quadro 2.</b> Primers utilizados no Sequenciamento de Sanger.....	76

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- AKT1:** *Serine/Threonine Kinase 1* (Serina-Treonina quinase 1)
- ASXL1:** *Transcriptional Regulator 1* (Regulador Transcricional 1)
- BCR/ABL1:** *Breakpoint Cluster Region/ Abelson 1* (Gene de fusão *Breakpoint Cluster Region/ Abelson 1*)
- CALR:** *Calreticuline* (Calreticulina)
- CBL:** Cbl proto-oncogene
- cDNA:** DNA complementário
- CDS:** Sequência codificante
- CXCL4:** *Platelet factor 4* (Quimiocina de Ligando 4 ou Fator plaquetário 4)
- CXCL12:** *C-X-C motif chemokine ligand 12* (Quimiocina de ligando 12 ou Fator 1 derivado de células estromais)
- DHL:** Lactato Deidrogenase
- DNMT3A:** *DNA methyltransferase 3 alpha* (DNA Metil-Transferasa 3)
- EPO:** Eritropoietina
- ERFE:** Eritroferrona
- ERK:** *Extracellular signal-regulated kinase* (Quinase regulada por sinais extracelulares)
- EZH2:** *Enhancer of Zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit* (Potenciador de zeste 2 polycomb complexo repressivo 2 subunidade)
- G-CSF:** Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
- HCPI:** Hematopoise Clonal de Potencial Indeterminado
- H1:** *Histone 1* (Histona 1)
- HIF-1 $\alpha$ :** *Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha* (Fator Induzível de Hipóxia 1 alfa)
- IDH1:** *Isocitrate dehydrogenase* (Isocitrato Dehidrogenase 1)
- IDH2:** *Isocitrate dehydrogenase* (Isocitrato Dehidrogenase 2)
- IL-10:** Interleucina 10
- INSL4:** *Insuline like 4*
- INSL6:** *Insuline like 6*
- JAK1:** Janus quinase 1
- JAK2:** Janus quinase 2
- JAK3:** Janus quinase 3

**LMC:** Leucemia mielóide crônica

**LMA:** Leucemia mielóide aguda

**MAPK:** *Mitogen-activated protein kinase 1* (Proteína Quinase Mitógeno Ativado)

**MF:** Mielofibrose

**MF-pós-PV:** Mielofibrose pós-Policitemia vera

**MF-pós-TE:** Mielofibrose pós-Trombocitemia Essencial

**MPL:** *Thrombopoietin receptor* (Receptor da Trombopoietina)

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para a Informação Biotecnológica)

**NET:** *Neutrophil Extracellular traps* (Armadilha extracelular de neutrófilos)

**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear factor- $\kappa$ B* (Fator Nuclear- kappa B)

**NMP:** Neoplasias Mieloproliferativas crônicas

**NGS:** *Next-Generation Sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração)

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase

**PI3K:** *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfatidil-Inositol Quinase 3)

**PV:** Policitemia vera

**RNA<sub>m</sub>:** Ácido ribonucleico mensageiro

**SF3B1:** *Splicing Factor 3B Subunit 1*

**SH2B3:** *SH2B adaptor protein 3*

**SNV:** Variação de um único nucleotídeo

**SOCS:** *Suppressor of cytokine signaling* (Supressor de citocina de sinalização)

**SRSF2:** *Serine and Arginine rich Splicing Factor 2*

**STAT:** *Suppressor of cytokine signaling* (Transdutor de sinal e ativador da transcrição)

**TE:** Trombocitemia Essencial

**TET2:** *Ten Eleven Translocation 2*

**TFG- $\beta$ :** *Transforming growth factor- $\beta$*  (Fator de Crescimento Transformante  $\beta$ )

**TPO:** Trombopoetina

**TP53:** *Tumor protein p53* (Proteína tumoral 53)

**TRF1:** Transferrina 1

**TYK2:** Tirosina quinase 2



**U2AF1:** *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1*

**ZRSR2:** *Zinc Finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2*

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Policitemia Vera .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2. Trombocitemia Essencial.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3. Mielofibrose .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Vias de Sinalização envolvidas nas Neoplasias Mieloproliferativas crônicas .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Gene <i>JAK2</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Proteína <i>JAK2</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5. Implicação clínica e molecular de variantes no gene <i>JAK2</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5.1. Variante <i>JAK2V617F</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.2. Variantes no éxon 12 do gene <i>JAK2</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>1.5.3. Outras variantes detectadas no gene <i>JAK2</i> envolvidas nas NMP. ....</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Área de estudo .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. População de estudo .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão .....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. Aspectos éticos .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5. Coleta de dados clínicos e laboratoriais .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6. Coleta das amostras .....</b>	<b>27</b>
<b>3.7. Análises da Hemostasia.....</b>	<b>28</b>
<b>3.9. Análises Hematológicas.....</b>	<b>28</b>
<b>3.10. Análise molecular para detecção de variantes na região codificante do gene <i>JAK2</i> ..</b>	<b>28</b>
<b>3.10.1. Extração de RNA.....</b>	<b>28</b>
<b>3.10.2. Síntese de cDNA .....</b>	<b>29</b>
<b>3.10.3. Reação em Cadeia da Polimerase .....</b>	<b>29</b>
<b>3.10.4. Reação de Sequenciamento de Sanger.....</b>	<b>32</b>
<b>3.11. Análise estatística .....</b>	<b>33</b>

3.12. Equipe do Projeto.....	33
3.13. Financiamento e infraestrutura .....	34
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
Capítulo I: .....	35
<i>JAK2</i> Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms.....	35
Capítulo II:.....	69
Panorama molecular do <i>JAK2</i> em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas do Estado do Amazonas .....	69
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>92</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>100</b>
7.1. ARTIGO DE COLABORAÇÃO SUBMETIDO NA REVISTA <i>BLOOD RESEARCH</i> 100	
7.2. PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA E PESQUISA (CEP).....	115
7.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	119
7.4. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA EXTRAÇÃO DE RNA COM REAGENTE TRIZOL .....	122
7.5. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA SÍNTESE DE cDNA.....	124
7.6. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	124
7.7. PROCEDIMENTO USADO PARA SEQUENCIAMENTO DE SANGER .....	127
7.8. PRODUTOS OBTIDOS DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE.....	131
7.9. VARIANTES IDENTIFICADAS POR SEQUENCIAMENTO DE SANGER .....	132

## INTRODUÇÃO

As Neoplasias Mieloproliferativas crônicas (NMP) representam um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula progenitora hematopoiética, caracterizadas atualmente por incrementada proliferação celular, desenvolvimento de inflamação crônica e associação com Hematopoiese clonal<sup>1,2,3</sup>. Rearranjos genéticos em vias de sinalização intracelular são as principais causas de desenvolvimento de Neoplasias Mieloproliferativas crônicas, destacando-se a via JAK/STAT como a via de sinalização de maior repercussão intracelular nestas doenças<sup>4</sup>.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), as Neoplasias Mieloproliferativas crônicas subdividem-se em *BCR/ABL1* positivo (leucemia mielóide crônica) e *BCR/ABL1* negativo, sendo as mais clássicas dentro deste último grupo policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibroscose<sup>1,5</sup>. Apesar de que a classificação de neoplasias mieloproliferativas crônicas ser baseada na presença ou ausência do gene de fusão *BCR/ABL1*; indivíduos com diagnóstico de policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibroscose podem apresentar o gene de fusão *BCR/ABL1 p210* em coexistência com a variante *JAK2V617F*<sup>6,7</sup>; evento molecularmente raro, mas que destaca a importância da pesquisa de ambas alterações genéticas de forma simultânea em indivíduos com NMP, como uma ação indispensável.

Variantes nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL* são as mais descritas nas neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo<sup>8</sup>. Policitemia vera é a neoplasia mieloproliferativa crônica *BCR/ABL1* negativo que apresenta mais variantes no gene Janus Quinase 2 (*JAK2*)<sup>9,10</sup>. O gene *JAK2* codifica uma proteína denominada pelo mesmo nome, que participa em uma das principais vias de sinalização intracelular: via JAK/STAT<sup>11</sup>. A maioria de variantes identificadas no *JAK2* resultam em ganho de função, caracterizadas como somáticas de tipo *missense* que conduzem a produção desregulada de células hematopoiéticas na medula óssea e acumulação de células maduras no sangue periférico<sup>12</sup>. A variante mais descrita no gene é a *JAK2V617F*, localizada no éxon 14 e caracterizada como uma substituição de uma guanina por uma timina na posição 1849, resultando na mudança do aminoácido Valina por uma Fenilalanina na posição 617, no domínio Pseudoquinase da estrutura proteica<sup>13,14</sup>; região de principal regulação positiva e negativa da proteína<sup>14,15</sup>.

A variante *JAK2V617F* é encontrada na Policitemia vera em até 95% e na trombocitemia essencial e na mielofibroscose em torno de 50-60%<sup>16</sup>, considerando-se um critério diagnóstico maior nas neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo. Segundo

estudos de cultura celular, células *JAK2V617F* positivas manifestam vantagem clonal em comparação com células selvagens, fato que confere intervenção indireta em vários processos de sinalização celular; potencializando interconexões com outras vias de sinalização (via PI3K/AKT1 e MAPK) que podem permitir a expressão de citocinas pro-inflamatórias, inclusive a nível do estroma medular<sup>17,18</sup>.

Por outro lado, variantes no éxon 12 do gene *JAK2* são identificadas em aproximadamente 3% dos pacientes negativos para *JAK2V617F*<sup>19</sup>. Alterações genéticas neste éxon incluem variações de tipo *missense* e *indels*<sup>20</sup>, as quais conferem um quadro de eritrocitose marcada em indivíduos com policitemia vera, apresentando-se em indivíduos mais jovens comparados à variante *JAK2V617F*<sup>21</sup>.

Apesar de que *JAK2V617F* e variantes no éxon 12 são as mais identificadas e descritas em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo, outras variantes tem sido identificadas em outros éxons de *JAK2*<sup>22,23</sup>, especialmente na extensão da região codificante de *JAK2*, afetando outros domínios proteicos de *JAK2*<sup>23,24,25</sup>. Mediante aplicação de sequenciamento de Sanger e Sequenciamento de nova Geração (*Next Generation Sequencing*), a maioria das variantes detectadas localizam-se nos éxons 6<sup>26</sup>, 9-10<sup>27</sup> 11-15<sup>23</sup>, e 19<sup>28</sup> que, segundo estudos, podem encontrar-se em coexistência e associar-se inclusive a transformação leucêmica e desenvolvimento de tumores sólidos não hematológicos<sup>27,28,29</sup>. De igual forma, sequenciamento de Sanger e Sequenciamento de nova Geração constituem atualmente ferramentas fundamentais na investigação de variantes genéticas em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas, especialmente em indivíduos triplo negativos<sup>30</sup>.

Embora grande número de pesquisas acerca de variantes genéticas associadas ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas crônicas sejam publicadas nos últimos anos, na região Amazônica este tópico não é altamente abordado nos setores de pesquisa científica, mencionando que até a data atual não existem publicações sobre este assunto. Assim, revela-se a necessidade de realizar investigações que visem caracterizar molecularmente variantes na região codificante do gene *JAK2*, para que sirva de informação relevante para discriminar com maior precisão os diferentes subtipos de neoplasias mieloproliferativas, e inclusive estabelecer prognósticos que direcionem as estratégias terapêuticas.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1. Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas

Atualmente as neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMP) são caracterizadas por incrementada proliferação celular, desenvolvimento de inflamação crônica e associação com Hematopoiese clonal<sup>3,31</sup>. São doenças clonais causadas por rearranjos genéticos em vias de sinalização intracelular que conduzem a superprodução simples ou multilinear dos elementos eritróides, mielóides ou megacariocíticos que, clinicamente predispõem a quadros de trombose, sangramento e transformação leucêmica<sup>32</sup>. Estas doenças hematológicas ocorrem principalmente em adultos, entre a quinta e sétima década da vida<sup>5</sup>. Não obstante, alguns subtipos são descritos em crianças; com incidência anual de todos os subtipos de 6 casos por cada 100 000 habitantes<sup>5</sup>. Estudos feitos sobre NMP expressam maior frequência em pessoas de raça branca com predomínio no sexo masculino<sup>5,33</sup>.

De acordo à Organização Mundial da Saúde (OMS) na última edição publicada no ano 2016, as Neoplasias Mieloproliferativas crônicas dividem-se em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR/ABL1* positivo (Leucemia Mielóide Crônica -LMC-) e Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo<sup>5</sup> - Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE), Mielofibrose (MF), Leucemia Neutrófila crônica, Leucemia Eosinofílica crônica e neoplasias mieloproliferativas não classificáveis - <sup>1,5,34</sup>. Porém Policitemia vera, Trombocitemia essencial e Mielofibrose constituem as doenças clássicas e mais frequentes deste grupo<sup>5,12,35</sup>, sendo a MF a de pior prognóstico das três doenças mieloproliferativas<sup>33</sup>.

Apesar de que a classificação de neoplasias mieloproliferativas crônicas baseia-se na presença ou ausência do gene de fusão *BCR/ABL1*, publicações atuais demonstram coexistência da variante *JAK2V617F* e transcritos de *BCR/ABL1*, especialmente em indivíduos com Leucemia Mielóide atípica (aqueles com resistência ao Imatinibe) e em indivíduos com Neoplasias Mieloproliferativas crônicas<sup>36,37</sup>, o que poderia ter repercussão nas opções terapêuticas destes indivíduos.

#### 1.1.1. Policitemia Vera

É considerada a neoplasia mieloproliferativa crônica *BCR/ABL1* negativo mais frequente, caracterizada pelo aumento significativo da massa eritrocitária, independente de mecanismos que normalmente regulam o processo de eritropoiese; assim a eritrocitose marcada constitui o achado mais importante nesta doença<sup>5,34</sup>. O aumento da massa eritrocitária também

acompanha-se de aumento de hemoglobina, hematócrito, número de granulócitos e plaquetas<sup>38</sup>, fato que determina a fase policitémica<sup>5</sup>. Quando o estágio de panmielose transforma-se em citopenias associadas a hematopoiese ineficaz, fibrose medular e presença de hiperesplenismo; reconhece-se o estado de Mielofibrose pós-Policitemia vera (MF-pos-PV)<sup>8</sup>, que tem pior prognóstico de vida<sup>5,33,34</sup>.

Segunda estatística mundial, a PV apresenta uma incidência de aproximadamente 0,84/100 000, com razão homem-mulher 2:1, demonstrando uma média de idade de 60 anos<sup>5</sup>. Não obstante, pesquisas feitas revelam idades entre 40 e 50 anos<sup>34,39,40</sup>. No Brasil, a epidemiologia de NMP não tem sido altamente estudada, ressaltando-se que a prevalência de PV não é um dado exatamente conhecido. No Estado de Santa Catarina e Recife os estudos do perfil genômico e clínico-laboratorial de neoplasias mieloproferativas revelam uma incidência anual de 0,35/100 000 indivíduos com uma prevalência de 27% para PV<sup>41,42</sup>.

Estudos brasileiros referem uma maior proporção de indivíduos com PV em comparação às outras Neoplasias Mieloproliferativas crônicas e prevalência oscilante entre 65-66,6 % nas mulheres<sup>43,44,45</sup>. A respeito da idade, a faixa etária da PV no Brasil corresponde entre a quinta e sétima década de vida<sup>41,42,44,45</sup>.

A patogenia da PV tem sido esclarecida como o descobrimento de defeitos na célula pluripotente e alterações moleculares em *JAK2*<sup>38</sup>. As principais alterações do gene *JAK2* na PV localizam-se no éxon 14 - variante *JAK2V617F* que constitui > 95% dos casos e associa-se a alto risco de transformação fibrótica e leucêmica<sup>33</sup> - e *indels* no éxon 12<sup>5,10,21</sup>. Estas alterações no gene *JAK2* contribuem na patogenia da PV, ao conferir sinalização constitutiva e ativação permanente de moléculas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição (STAT), assim como sinalização celular de outras vias como da Proteína Quinase Mitógeno Ativado (MAPK) e Fosfatidil-Inositol Quinase 3/Serina-Treonina quinase 1 (PI3K/AKT1), desregulando o processo de diferenciação e maturação celular<sup>46</sup>.

#### **1.1.1.1. Critérios diagnósticos e Manifestações clínicas de PV**

Para o diagnóstico da PV definem-se critérios maiores e menores, estabelecendo que para o diagnóstico desta doença precisa-se da existência de 3 critérios maiores ou 2 critérios maiores e um critério menor (**Quadro 1**).

**Quadro 1.** Critérios diagnósticos da Policitemia vera; OMS, 2016<sup>1,5</sup>.

Critérios maiores
1- Hemoglobina > 16.5 g/dL em homens; > 16.0 g/dL em mulheres. Hematócrito > 49% em homens e > 48% em mulheres.
2- Biopsia medular hiperclular com presença das três linhagens (panmielose)
3- Presença da variante <i>JAK2V617F</i> ou outra variante no éxon 12 do gene <i>JAK2</i>
Critério Menor
1- Baixo nível sérico de Eritropoietina (EPO)

A medula óssea de indivíduos com PV demonstra hiperclularidade com hiperplasia eritróide, megacariocítica e granulocítica<sup>47</sup>. No entanto, aproximadamente 80% de adultos com PV são assintomáticos<sup>47</sup>, geralmente diagnosticados pela detecção incidental de valores aumentados de hemoglobina ou hematócrito no hemograma. Além do aumento da hemoglobina e hematócrito, aumento da massa eritrocitária e plaquetose são identificados no esfregaço sanguíneo. Proliferação e renovação celular exacerbada pode causar hiperuricemia e gota<sup>34,38</sup> confirmados por altos níveis de DHL (Lactato Desidrogenase) e Ácido Úrico<sup>47</sup>. Igualmente, os achados sanguíneos são concordantes com quadros de dispneia, cansaço, sudorese, perda de peso, pletora, hepatomegalia e esplenomegalia palpável<sup>5</sup>, e até picos hipertensivos, produto da hiperviscosidade sanguínea<sup>47</sup> que agudiza quadros de cefaleias, vertigem, alterações visuais, eritromelalgia e prurido<sup>34,38</sup> e indiretamente produz anormalidades cardiovasculares<sup>38</sup>.

Eventos trombóticos em vasos sanguíneos pequenos leva a dilatação dolorosa ou ulceração dos vasos nas extremidades, enquanto que nos vasos sanguíneos maiores podem provocar infarto do miocárdio, acidente cérebro vascular, trombose venosa profunda e trombose de veia esplênica<sup>5,34,38</sup>. Esse último quadro é mais frequente em indivíduos com MF-pós-PV<sup>48</sup>. Eventos tromboembólicos são mais documentados no tempo do diagnóstico, geralmente nos dois primeiros anos do seguimento do diagnóstico<sup>34</sup>, enquanto que 1/3 de pacientes relata ocorrência destes após diagnóstico. Eventos hemorrágicos são reportados em menor frequência<sup>48</sup>, associados a anormalidade plaquetária e consequente manifestação de epistaxes, hematomas e doença de von Willebrand adquirida<sup>49</sup>, relacionado eventualmente com alteração de testes da hemostasia como Tempo de Protrombina<sup>50,51</sup>.

Por outro lado, avaliação do Tempo de Protrombina-INR, Tempo de Tromboplastina Parcial ativada, Fibrinogênio, Dímero-D, Tempo de Trombina e Produtos de degradação de fibrina permitem avaliar incrementada ativação da hemostasia e indiretamente o desenvolvimento de trombose ou hemorragias nos indivíduos com NMP<sup>51</sup>.



### 1.1.2. Trombocitemia Essencial

A Trombocitemia Essencial (TE) é a neoplasia mieloproliferativa crônica caracterizada pela proliferação clonal de megacariócitos na medula óssea<sup>5,38</sup> e manifestada por trombocitose no sangue periférico ( $> 450 \times 10^3/\text{mm}^3$ )<sup>5</sup>. Atualmente não existem marcadores genéticos ou biológicos específicos para TE, portanto a presença isolada de trombocitose não constitui um marcador específico para TE e deve ser excluída de quadros de trombocitose reativos assim como de outras NMP como PV, MF e LMC<sup>5,34,38</sup>.

De acordo à Organização Mundial da Saúde, a incidência estimada para TE oscila de 0.2-2.3/100 000 habitantes, com predomínio do sexo feminino em idades oscilantes entre 50 a 60 anos<sup>52</sup>. Porém, existem estudos em pacientes com TE que revelam idades de 30 anos<sup>8</sup>.

No Brasil, a prevalência de TE ainda não é um dado esclarecido; no entanto pesquisas realizadas em Recife e Santa Catarina entre os anos 2016 e 2018, respectivamente, sobre caracterização molecular de neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo revelam uma incidência de 0,7/100 000 indivíduos com TE e uma prevalência oscilante entre 54,5% a 57%<sup>41,42</sup>. Além disso, a Universidade Estadual de Maringá realizou um estudo que recrutou indivíduos com NMP, identificando que de 73 indivíduos 28,7% apresentou diagnóstico de TE, seguido de PV com 26,8%<sup>53</sup>. Estado de Pernambuco, também apresenta alta frequência diagnóstica de TE seguido de PV<sup>54</sup>.

Estes estudos apontam que o gênero mais afetado pela doença é a população feminina, dado relacionado com as estatísticas a nível mundial. Por sua vez, a variável idade também mantém correspondência com os dados apresentados pela OMS, ressaltando-se que a idade média nos pacientes com TE no Brasil encontra-se na quinta década de vida<sup>41,42</sup>.

As causas da TE são ainda desconhecidas<sup>5,38</sup>, no entanto a variante *JAK2V617F* pode ser encontrada em alguns indivíduos até 50% de frequência; nomeando que recentemente esta variante foi encontrada em casos de TE hereditária<sup>5,34</sup>. Contudo, variantes nos genes *MPL* e *TPO* são mais associadas a TE de herança familiar<sup>55,56</sup>. Alta Frequência de variante alélica de *JAK2V617F* em TE vincula-se com alto risco de trombose e quadros hemorrágicos por aumento e disfuncionalidade plaquetária<sup>32</sup>. Em indivíduos com TE *JAK2V617F* negativo, alterações no gene do receptor de Trombopoietina (*MPL*) podem-se apresentar em baixa porcentagem, aproximadamente de 1 a 5%<sup>39, 52,57,58</sup>. No entanto publicações cubanas e brasileiras apontam porcentagens de mais de 10% de afetação no gene *MPL* em indivíduos com TE<sup>32,34</sup>.

O gene *MPL* é expresso nos progenitores hematopoiéticos e nas células da linhagem megacariocítica, codificante do receptor da Trombopoietina (MPL). Em condições normais, a Trombopoietina (TPO) liga-se ao receptor de Trombopoietina (MLP) produzindo fosforilação de MPL e seguida ativação de JAK2, o que inicia uma cascata de eventos de sinalização que regulam a replicação, diferenciação e sobrevivência celular<sup>32</sup>. Quando existem variantes nos genes *MPL* e *JAK2* produzem-se alterações na sinalização intracelular; que conseqüentemente conduzem a proliferação celular aberrante<sup>32,34,59</sup>. Indivíduos com alterações no gene *MPL* tem maior risco de complicações trombóticas pela alta contagem plaquetária e níveis aumentados da eritropoietina (EPO)<sup>32</sup>.

Por outro lado, variantes no gene *CALR* são identificadas em indivíduos com TE, demonstrando uma frequência de até 50% em pacientes negativos para variantes nos genes *JAK2* e *MPL*<sup>57</sup>, razão pela qual variantes no gene *CALR* são consideradas como o segundo marcador genético mais prevalente nas Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL* negativo depois de *JAK2V617F*<sup>32,58</sup>. Mutações tipo I e II do gene *CALR* são encontradas na TE. No entanto as de tipo I apresentam maior frequência e associam-se a risco significativo de fenótipos mielofibróticos; em contraste com as mutações tipo II, que associam-se com baixo risco de trombose e evolução clínica indolente (apesar de altas contagens de plaquetas)<sup>10,60</sup>.

#### 1.1.2.1. Critérios diagnósticos e Manifestações clínicas de TE

Os critérios expostos pela OMS para diagnóstico de TE definem critérios maiores e menores, estabelecendo que para o diagnóstico desta doença precisa-se da existência de 3 critérios maiores ou 2 critérios maiores e um critério menor (**Quadro 2**).

**Quadro 2.** Critérios diagnósticos da Trombocitemia Essencial; OMS, 2016<sup>1,5</sup>.

Critérios maiores
1- Contagem plaquetária $\geq 450 \times 10^3/\text{mm}^3$
2- Medula óssea com proliferação da linhagem megacariocítica, com número aumentado de megacariócitos grandes e maduros
3- Sem critérios para PV, MF, LMC, síndromes mielodisplásicos e outras neoplasias mielóides.
4- Presença de variantes em <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i>
Critério Menor
1- Demonstração de um marcador clonal ou ausência de Trombocitose reativa.

A medula óssea de indivíduos com TE pode exibir padrões normocelulares até hipercelulares com presença marcada de megacariócitos, células que podem apresentar anormalidades morfológicas como aumento citoplasmático e hiper-lobulação nuclear prominente<sup>47,61</sup>. Extensões sanguíneas de indivíduos com TE mostram anisocitose plaquetária determinada por macroplaquetas, trombocitose moderada ou grave com presença de morfologia leucocitária e eritrocitária normal<sup>47</sup>.

A respeito da clínica, a TE apresenta um curso indolente, por descoberta incidental de alta contagem plaquetária no hemograma<sup>34</sup>. A esplenomegalia encontra-se em baixa porcentagem (aproximadamente 5% dos casos), sugerindo que incremento no tamanho do baço pode indicar evolução a MF, PV ou LMC<sup>52</sup>. A evolução de TE ocorre em menos de 10% e menos de 2%, para MF e PV respectivamente.

O risco trombótico é alto em pacientes com TE *JAK2* mutados, mencionando que a maioria de pacientes apresenta quadros trombóticos venosos ou arteriais, sendo a trombose arterial mais comum<sup>34</sup> e a principal causa de mortalidade na TE<sup>52</sup>. O sistema microvascular pode ser afetado por oclusão, o que produz isquemia transitória, convulsões, eritromelalgia, alterações auditivas e visuais transitórias, cefaleias recorrentes e parestesias, como na PV<sup>38</sup>.

Sabe-se que quadros hemorrágicos são menos frequentes na TE. Contudo, sangramentos gastrointestinais assim como desenvolvimento de varizes esofágicas e gástricas são descritas nestes pacientes, devido a hipertensão de via porta ou síndrome de von Willebrand adquirida por excessiva trombocitose (contagem plaquetária  $\geq 1000$  plaquetas/mm<sup>3</sup>)<sup>38,52,62</sup>, achado que pode relacionar-se eventualmente com alteração de testes da hemostasia como Tempo de Protrombina e Tempo de tromboplastina Parcial ativada<sup>50</sup>.

### **1.1.3. Mielofibrose**

A Mielofibrose (MF) pode-se gerar por modificações *de novo* no processo da hematopoiese (Mielofibrose Primária) ou por evolução de outras doenças como PV ou TE (Mielofibrose secundária); denominando-se como Mielofibrose pós-Policitemia Vera (MF-pós-PV) ou Mielofibrose pós-Trombocitemia essencial (MF-pós TE), respectivamente. Destaca-se, que todas elas têm progressão para transformação leucêmica<sup>5,33,63</sup>. Estima-se que a MF-pós- PV apresenta uma prevalência de 20% e a MF-pós TE de 10%, e que a transformação ocorre até 15

anos após diagnóstico inicial, enquanto que a transformação a leucemia aguda ocorre em <10% e <5% de PV e TE, respectivamente, 20 anos após diagnóstico inicial<sup>64</sup>.

A Mielofibrose (MF) é a neoplasia clonal de pior prognóstico das NMP<sup>33,38</sup>, caracterizada pela proliferação anormal de megacariócitos e granulócitos na medula óssea, associada a fibrose progressiva de reticulina ou colágeno no estroma medular e hematopoiese extramedular<sup>5</sup>. Apresenta-se em duas etapas de evolução: fase pré-fibrótica, determinada por hiperplasia na medula óssea com ausência de fibrose reticular; e fase fibrótica marcada por fibrose reticular na medula óssea e presença de leucoeritroblastose no sangue periférico<sup>5,63</sup>. Portanto é a única NMP na qual a biópsia da medula óssea é essencial para estabelecer o diagnóstico<sup>33</sup>.

A MF é o desordem mieloproliferativo menos comum do grupo das neoplasias *BCR/ABL1* negativo que apresenta uma incidência anual de 0.5-1.5/100 000 habitantes, indicando que de 30 a 50% dos casos correspondem à fase Pre-fibrótica<sup>5</sup>. Afeta a indivíduos com idade média de 60 anos, geralmente em sujeitos de ambos os sexos<sup>52,57</sup>. No entanto algumas pesquisas revelam discreto predomínio em homens<sup>33</sup>.

Prevalência de MF no Brasil é de escasso conhecimento. Investigações realizadas em Recife e Santa Catarina, apontam que a prevalência de MF oscila entre 16 a 18,2%, com incidência relativa de 0,23/100 000 indivíduos, geralmente com idade oscilante entre 57,3 a 59 anos<sup>41,42</sup>. No Brasil observa-se que a distribuição de MF entre os sexos é variável, pois alguns estudos revelam leve predomínio em homens<sup>42,65</sup>; e outros em mulheres<sup>41</sup>.

O desenvolvimento de MF geralmente envolve anormalidades nos genes *JAK2*, *CARL* e *MPL*, que implicam a funcionalidade das proteínas codificadas por estes genes<sup>5,34,57,60</sup>. *JAK2* em condição selvagem interage com outras proteínas citoplasmáticas como Calreticulina (*CALR*) e o receptor de Trombopoietina (*MPL*) para iniciar processos de sinalização celular. Assim, alterações *JAKV617F*, *MPLW515L/K* e no éxon 9 do gene *CALR* podem estar presentes na MF, variantes que tanto exclusiva como conjuntamente conferem ativação constitutiva da via JAK/STAT em ausência de fatores de crescimento, e consequente transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e processos apoptóticos<sup>63</sup>, fato que conduz a hiper-produção de células na medula óssea e conseguinte acumulação celular no sangue periférico.

Igualmente, variantes nos genes de regulação epigenética como *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *DNMT3A* e *TP53* podem identificar-se na MF<sup>47</sup>, porém variantes em *ASXL1* têm sido altamente descritas na MF<sup>66</sup>, associadas a fenótipo agressivo da doença, inclusive pela aparição de

anormalidades cromossômicas como  $i(17q)$ ,  $inv(3)$ ,  $12p-$ ,  $+8$ ,  $7q-$ ,  $5q-$  e  $20q-$  que atribuem um prognóstico desfavorável e alto risco de transformação leucêmica<sup>32,52,63</sup>.

A variante *JAK2V617F* nas NMP e o risco de progressão para MF estão associados à frequência de variante alélica da mutação<sup>33</sup>. Frequências alélicas de *JAK2V617F* superiores a 50% em PV e TE mostram risco significativo de eventos trombóticos e evolução a Mielofibrose ou transformação leucêmica. Na MF, níveis inferiores de frequência alélica de *JAK2V617F* (1-25%) são os que apresentam pior prognóstico<sup>33,58</sup>.

### 1.1.3.1. Critérios diagnósticos e manifestações clínicas da MF

Os critérios diagnósticos estabelecidos para o diagnóstico de MF subdividem-se de acordo à etapa da doença: pré-fibrótica e Fibrótica. Para diagnóstico de MF fase pré-Fibrótica precisa-se da existência de 3 critérios maiores e ao menos 1 critério menor, este último confirmado em duas vezes consecutivas (**Quadro 3**).

**Quadro 3.** Critérios diagnósticos da Mielofibrose/fase pré-Fibrótica; OMS, 2016<sup>1,5</sup>.

Critérios maiores
1- Medula óssea hipercelular, com proliferação atípica da linhagem megacariocítica, sem fibrose reticular grau >1. Proliferação granulocítica e diminuição da eritropoiese.
2- Sem critérios para PV, TE, LMC, síndromes mielodisplásicas e outras neoplasias mielóides.
3- Presença de mutações nos genes <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , <i>MPL</i> ou outro marcador clonal ou ausência de Fibrose reticular secundária.
Critérios Menores
1- Anemia
2- Leucocitose $\geq 11 \times 10^3/\text{mm}^3$
3- Esplenomegalia palpável
4- Aumento da Lactato Desidrogenase (DHL)

Para diagnóstico de MF fase Fibrótica precisa-se da existência de 3 critérios maiores e ao menos 1 critério menor, este último confirmado duas vezes (**Quadro 4**).

**Quadro 4.** Critérios diagnósticos da Mielofibrose/fase Fibrótica; OMS, 2016<sup>1,5</sup>.

Critérios maiores
1- Medula óssea hiper celular com proliferação atípica da linhagem megacariocítica, com fibrose de reticulina ou colágeno grau 2 ou 3.
2- Sem critérios para PV, TE, LMC, síndromes mielodisplásicos e outras neoplasias mielóides.
3- Presença de mutações nos genes <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , <i>MPL</i> ou outro marcador clonal ou ausência de Fibrose reticular secundaria.
Critério Menor
1- Anemia
2- Leucocitose $\geq 11 \times 10^3/\text{mm}^3$
3- Esplenomegalia palpável
4- Aumento da DHL
5- Leucoeritroblastose

A doença em geral é detectada pela descoberta incidental de alterações no hemograma<sup>57</sup>. Além da fibrose reticulínica ou colágena, aspirados medulares de indivíduos com MF mostram hiper celularidade com hiperplasia megacariocítica, proliferação granulocítica e diminuída proporção de progenitores eritróides (achado diretamente relacionado com a anemia apresentada nestes pacientes)<sup>47</sup>. Anemia é confirmada na metade dos pacientes e tem etiologia multifatorial<sup>33</sup>, incluindo redução da eritropoiese medular, hematopoiese ineficaz e hiperesplenismo; que induz sequestro esplênico, sangramentos, hemólise auto-imune ou secundária ao processo inflamatório crônico<sup>52</sup>.

Displasia megacariocítica também pode identificar-se mediante observação de megacariócitos hipo-lobulados e micromegacariócitos<sup>47</sup>. Achados no sangue periférico são consistentes com aumento de progenitores hematopoiéticos granulocíticos com expressão de CD34<sup>+</sup><sup>5,52</sup> e presença de anisocitose, dacriócitos, hipocromia eritrocitária e plaquetas gigantes<sup>33</sup>. Igualmente, incrementada circulação de monócitos na MF constitui um fator de prognóstico adverso nestes pacientes, pois contribuem na progressão de fibrose por liberação de fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) em resposta a moléculas de adesão e produção de citocinas fibróticas<sup>67</sup>.

A respeito das manifestações clínicas, nenhum sintoma é específico para MF<sup>57</sup>. O baço é o principal órgão de hematopoiese extramedular na MF<sup>52</sup>. Seu aumento pode levar a hipertensão portal, ascite e infarto esplênico acompanhado de febre e dor torácica. Também pode apresentar-se obstrução intestinal, uretral ou pericárdica<sup>34,52</sup>. Podem ser detectados tumores hematopoiéticos por encapsulação de tecido conectivo em pleura, pele, pericárdio,

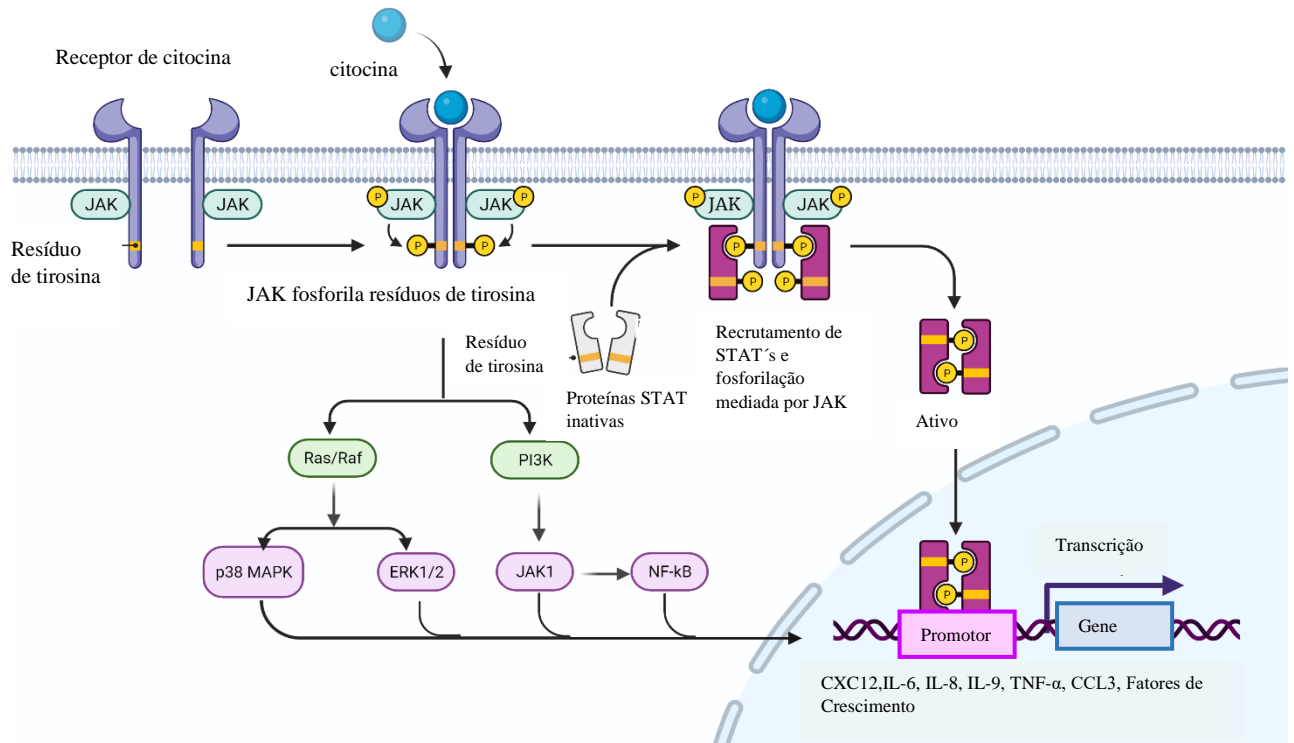
ovários, rins e trato gastrointestinal<sup>68</sup>. Estado hiper-metabólico pode se manifestar com febre, anorexia, perda de peso, quadro que relaciona-se com pior prognóstico<sup>52</sup>.

## 1.2. Vias de Sinalização envolvidas nas Neoplasias Mieloproliferativas crônicas

O processo de sinalização surge através da ligação de citocinas a receptores específicos expressados na superfície celular<sup>69</sup>. Receptores de citocinas classe I ou homodiméricas (interleucinas, EPO, hormônios de crescimento, fatores estimulantes de colônias - G-CSF - e Trombopoietina –TPO-) utilizam a sinalização da proteína Janus quinase 2 (JAK2); enquanto que receptores de citocinas classe II ou heterodiméricas (moléculas geralmente associadas à inflamação, como interferons e IL-10) utilizam JAK1, JAK3 ou Tirosina quinase 2 (TYK2)<sup>15,70</sup>. Os receptores de citocinas homodiméricas são proteínas transmembranas, dotadas de regiões extracelulares de homologia de receptor de citocinas (CHR) que ligam a molécula a seu receptor e ativam a sinalização de proteínas intracelulares como JAK2; proteína de maior importância na interação entre receptores e citocinas hematopoiéticas<sup>69</sup>. A internalização da citocina, produz uma ativação dos domínios intracelulares do receptor e do domínio N-terminal da proteína JAK2; localizado em uma região proximal ao receptor; conduzindo a fosforilação e recrutamento de proteínas citoplasmáticas transdutoras de sinal e ativadoras de Transcrição (STAT), especialmente da classe STAT3 e STAT5<sup>71</sup>. Moléculas STAT's dimerizam-se e transportam-se ao núcleo para iniciar a transcrição de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (proliferação, diferenciação e apoptose)<sup>4,71</sup>. Recentemente descobriu-se que JAK2 pode-se transportar ao núcleo e fosforilar Histona 1 (H1) e ciclina dependente de quinases<sup>71</sup>, achado que impacta diretamente a cromatina celular e que pode constituir futuramente um novo alvo terapêutico.

A via JAK/STAT é a via com maior número de alterações nas neoplasias mieloproliferativas crônicas<sup>59,72</sup>, possuindo conexões com outras vias de sinalização como PI3K/AKT através de interações com as proteínas JAK1/JAK2 e STAT3, o que pode conduzir ao desenvolvimento de mecanismos tumorigênicos e inflamatórios<sup>4</sup> (**Figura 1**). Habel e colaboradores, realizaram um estudo no ano 2020 e observaram que quadros inflamatórios crônicos em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) estão relacionados à ativação da sinalização JAK/STAT, detectando altas concentrações de citocinas inflamatórias e altos níveis de ativação de STAT5a e STAT3 em indivíduos com LMA comparado com indivíduos saudáveis<sup>73</sup>. Por outro lado, proteínas de sinalização Ras/Raf/MAPK (Proteína quinase

Mitógeno Ativado) são ativadas através da interação com STAT3 e a via PI3K/AKT1, o que favorece a atividade antiapoptótica por ativação de moléculas como Bcl2, Ciclina D e BclxL<sup>71</sup> e surgimento de carcinogênese<sup>4</sup>. Assim, a pesquisa de interconexões em sinalizações intracelulares ajudará na compreensão de mecanismos de transdução de sinais intracelulares.



**Figura 1.** Vias de Sinalização envolvidas nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas.  
**Fonte:** G Torres D e colaboradores (2022)<sup>74</sup>

### 1.3. Gene *JAK2*

O gene *JAK2* (ID NCBI: 3717) localiza-se no cromossomo 9, locus p24.1. O gene completo está constituído de 145,559 nucleotídeos, distribuídos em 27 éxons. Segundo Centro Nacional para a Informação Biotecnológica (NCBI), *JAK2* pode apresentar *splicing* alternativo, originando 9 tipos de transcritos, descritos no **quadro 5**.

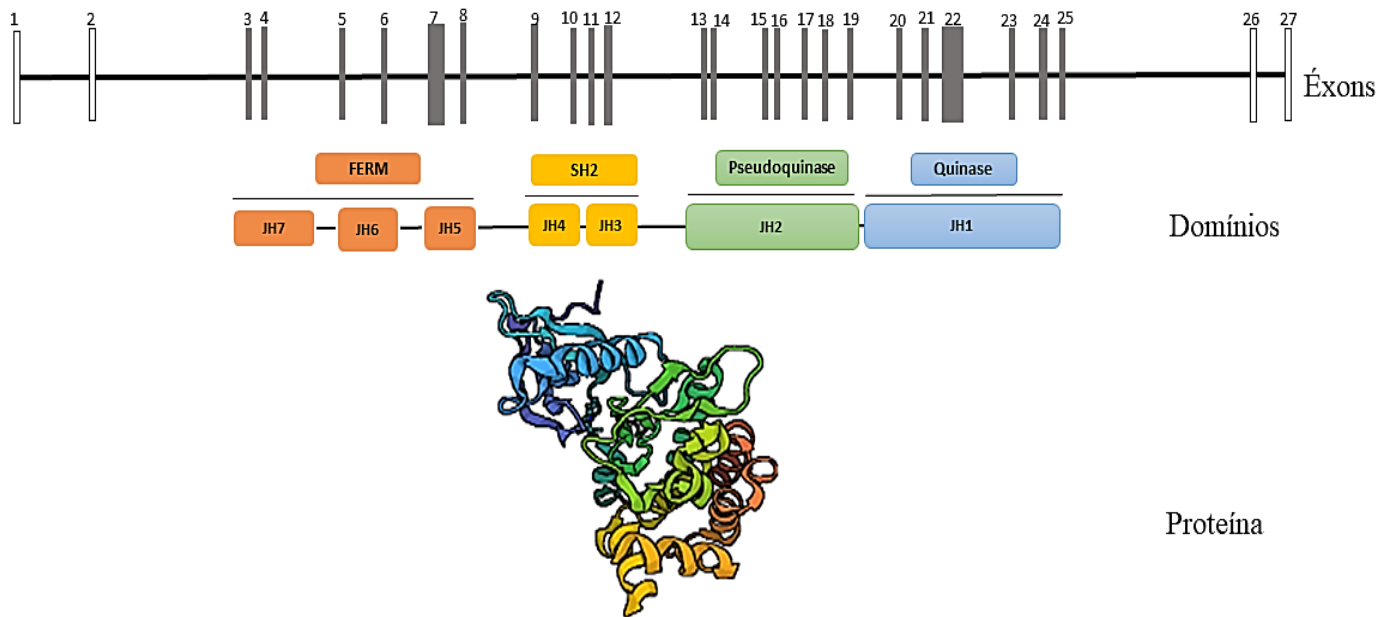


**Quadro 5.** Transcritos de *JAK2*, Segundo Centro Nacional para a Informação Biotecnológica (NCBI).

Transcrito	Nomenclatura do transcrito	Alteração funcional	Tamanho do transcrito (pb)
Transcrito 1, RNAm	NM_004972.3	Codificante	5285
Transcrito 2, RNAm	NM_001322194.2	Codificante	7151
Transcrito 3, RNAm	NM_001322195.2	Codificante	6669
Transcrito 4, RNAm	NM_001322196.2	Codificante	6940
Transcrito 5, RNAm	NM_001322204.2	Codificante	6582
Transcrito 6, RNAm	NM_001322198.2	Codificante	6928
Transcrito 7, RNAm	NM_001322199.2	Codificante	6870
Transcrito 8, RNAm	NR_169763.1	Não Codificante	7040
Transcrito 9, RNAm	NR_169764.1	Não Codificante	6957

Do total de transcritos registrados, o transcrito 2: NM\_001322194.2 (gerado por um RNAm de 7151 bp) é considerado o transcrito de referência, capaz de gerar uma proteína funcional envolvida em processos de sinalização intracelular: JAK2.

Segundo investigações atuais, a JAK2 não somente encontra-se desregulado em doenças hematológicas, mas também se encontra desregulada em tumores sólidos<sup>28,29</sup>. O estudo de Liu Qiang e colaboradores mostrou a desregulação da *JAK2* em indivíduos com câncer de mama, associado a prognóstico favorável<sup>75</sup>. A sequência codificante (CDS) de *JAK2* tem uma extensão de 3399 nucleotídeos, distribuída em 23 éxons, do éxon 3 até o éxon 25, que codifica uma proteína de 1132  $\alpha$ .aminoácidos, do tipo tirosina quinase não receptora, denominada JAK2 (**Figura 2**). Dos éxons que pertencem à sequência codificante do *JAK2*, os éxons 3, 7, 11, 20, 22 e 25 são os de maior tamanho na sequência nucleotídica. Contudo, algumas variantes adquiridas nestas secções do gene são descritas como benignas ou de significado clínico incerto, sendo os éxons 11-15 os que possuem maiores descrições de variantes com significado clínico variado.



**Figura 2.** Estrutura gênica e proteica de JAK2.

**Fonte:** Próprio autor: Dania I. Gutiérrez Torres

#### 1.4. Proteína JAK2

O gene *JAK2* gera um RNAm de 7151 pb, que após tradução origina um produto de 1132  $\alpha$ -aminoácidos, constituindo a proteína Janus quinase 2. É descrita como uma proteína tirosina quinase não receptora citoplasmática associada a receptores de citocinas de classe I ou homodiméricas, envolvida diretamente na ativação de sinais intracelulares<sup>58</sup>.

A proteína JAK2 possui 4 domínios estruturais. A porção N-terminal da proteína contém os domínios FERM e SH2<sup>20</sup>. O domínio FERM (4.1/Ezrina/ Radixina/Moesina) localiza-se entre os  $\alpha$ -aminoácidos 35-380, constituído pelos domínios homólogos JH5, JH6 e JH7<sup>15,76</sup>. O domínio SH2 (Src de Homologia 2) localiza-se entre os  $\alpha$ -aminoácidos 401-482 e contém os domínios homólogos JH4 e JH3<sup>71,76</sup>, constituindo o domínio de menor tamanho da proteína. Os domínios FERM e SH2 formam uma unidade estrutural que adapta-se a regiões citoplasmáticas dos receptores de citocinas denominadas Box 1 e Box 2; áreas responsáveis pela afinidade e especificidade da ligação citocina-receptor<sup>15</sup>. O domínio FERM possui três lóbulos denominados F1, F2 e F3; dos quais F2 é quem apresenta maior ligação entre a membrana proximal da região Box1 com o receptor; fato atribuído à carga positiva de F2, o que aparentemente confere alta interação com a membrana celular, enquanto que o domínio SH2 interage com Box 2, que ativa a cadeia de sinalização para o domínio quinase<sup>69</sup>. Contudo, os

mecanismos de como ambos os domínios apresentam afinidade no receptor ainda permanecem em estudo.

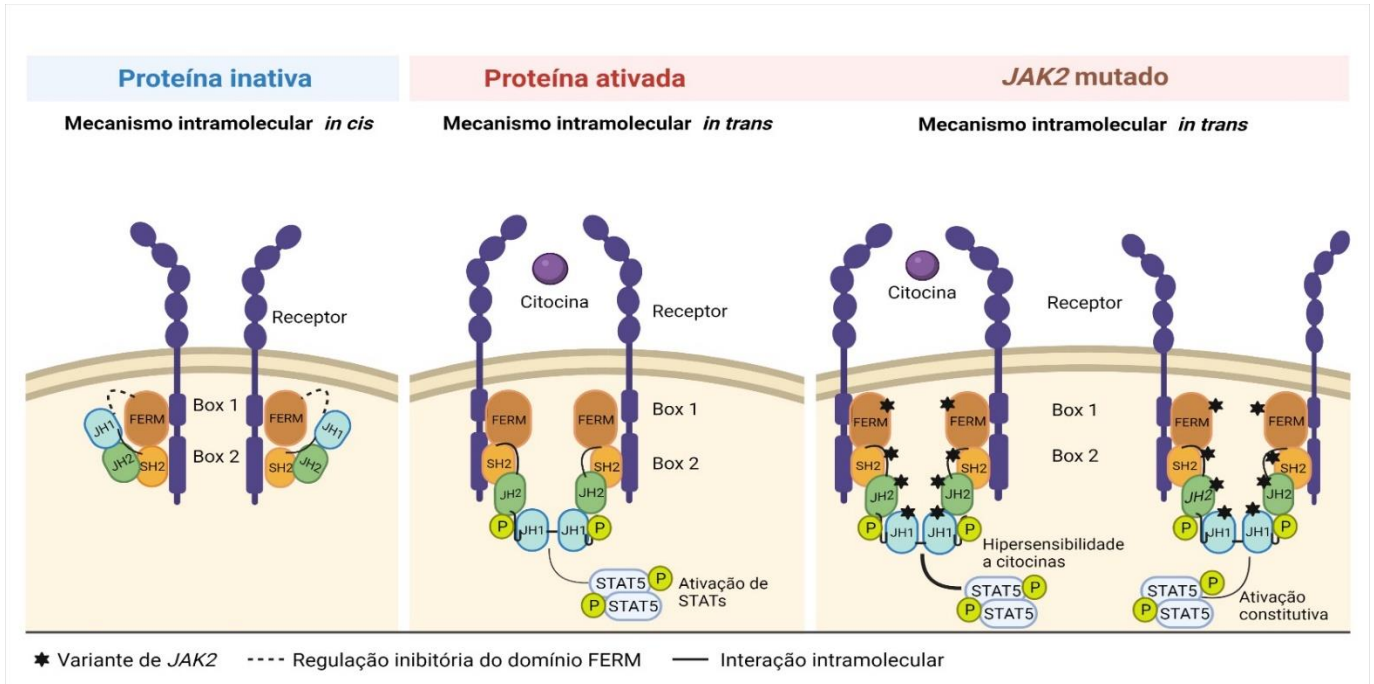
Além de conferir afinidade na ligação citocina-receptor FERM também atua na ativação e na atividade inibitória da JAK2<sup>76,77</sup>. Assim, o estudo de Zhao e colaboradores demonstrou que o domínio FERM apresenta efeitos opostos na atividade quinase de JAK2 selvagem e *JAK2V617F* mediante interação com JH1. Na condição selvagem, FERM inibe atividade de JAK2, mas em presença de *JAK2V617F*, FERM é essencial para sua hiperativação<sup>77</sup>. Assim, destaca-se que a presença de variantes neste domínio poderia resultar em uma incrementada atividade basal de JAK2<sup>77</sup>. Igualmente, é descrito que interação entre FERM-SH2 facilita a inibição de JH1 mediante JH2<sup>76</sup>.

Por outro lado, na porção C-terminal da proteína JAK2 reconhecem-se os domínios Pseudoquinase e quinase, que inclui os domínios homólogos JH2 e JH1 -*JAK Homology 1 and 2* -, respectivamente<sup>8</sup>. O domínio Pseudoquinase (JH2) abrange os  $\alpha$ -aminoácidos 545-809, e exerce um efeito regulatório positivo e negativo sobre o domínio quinase (JH1)<sup>14,76</sup>, domínio de principal atividade catalítica da proteína que compreende os  $\alpha$ -aminoácidos 849-1124<sup>76</sup>. Segundo estudos, a atividade catalítica encontra-se extremamente baixa no domínio JH2 em ausência de variantes, incapaz de levar a ativação independente<sup>15</sup>.

A atividade proteica de JAK2 depende de mecanismos regulatórios de sinalização baseados em interações intramoleculares de fosforilação em *cis* e *trans*<sup>69</sup>. O mecanismo em *cis* ocorre ante ausência de ligando, fato que impede ativação de Box 1 e Box 2 (regiões intracitoplasmáticas dos receptores) e consequente sinalização nos domínios da região N-terminal de JAK2. Esse mecanismo gera interação entre os domínios SH2-JH2, que conferem autofosforilação de resíduos S523 e Y570, localizados em JH2, e portanto inibição basal da proteína<sup>14,20,78</sup>. Enquanto que, o mecanismo em *trans* conduz a ativação da proteína mediante reconhecimento de ligação citocina-receptor, conferindo ativação e estabilização de dímeros de receptores intracitoplasmáticos<sup>20</sup>; assim como câmbio conformacional na estrutura de JAK2 através de interações entre os domínios JH1-JH1<sup>79</sup>, o que conduz a fosforilação dos resíduos Tyr1007 e Tyr1008, conferindo estado ativo da proteína e recrutamento de moléculas STATs<sup>20,71</sup>.

Alterações na proteína produzem desestabilização na interação JH1-JH2 e portanto alteração na função dela, sendo uma das principais variantes implicadas na desregulação da função de JAK2 a variante *JAK2V617F*, encontrada com maior frequência nas Neoplasias

Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo<sup>72,80</sup> (**Figura 3**). Apesar de que novas alterações em *JAK2* estão emergindo; pesquisas demonstram o grande interesse no estudo de *JAK2V617F* por suas implicações na Hematopoiese clonal, na desestabilização imunológica e na progressão das NMP<sup>31,81,82,83</sup>.



**Figura 3.** Interação intramolecular entre os domínios da proteína JAK2.

**Fonte:** Próprio autor: Dania I. Gutiérrez Torres.

### 1.5. Implicação clínica e molecular de variantes no gene *JAK2*

Com o avanço das técnicas diagnósticas moleculares, novas alterações no gene *JAK2* estão sendo identificadas com significado clínico benigno, patogênico e até de significado incerto, sendo preciso a realização de maiores estudos para compreensão molecular e funcional das mesmas. A variante *JAK2V617F*, localizada no éxon 14 tem sido altamente associada a NMP<sup>70</sup> e inclusive encontrada em coexistência com o gene de fusão *BCR/ABL1* em alguns casos de LMC, especialmente em indivíduos masculinos com persistência de Trombocitose sem resposta a terapia citoredutora<sup>36,84</sup>; revelando uma faixa de incidência entre 0,20 a 2,55%<sup>84,85</sup>. Além do éxon 14, variantes nos éxons 11, 12, 13 e 15 do gene *JAK2* também vinculam-se a doenças hematológicas<sup>86</sup>. Contudo, novas variantes em outros éxons de *JAK2* estão-se descrevendo, sendo necessário mais estudos para compreender o mecanismo molecular delas e sua possível ligação com quadros mieloproliferativos.

### 1.5.1. Variante *JAK2V617F*

No ano 2005, vários grupos independentes identificaram a variante *JAK2V617F* (ID dbSNP: *rs77375493*, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs77375493>, acesso em 08 de abril, 2022), localizada no éxon 14 do gene *JAK2*<sup>87,88,89</sup>. A variante foi descrita como uma substituição de uma Guanina (G) por uma Timina (T) no nucleotídeo 1849, localizado no domínio proteico Pseudoquinase (JH2), resultando na substituição de  $\alpha$ .aminoácidos de valina por fenilalanina na posição 617 da cadeia polipeptídica do produto do gene e conduzindo a ativação constitutiva da proteína *JAK2*<sup>70</sup> [ID ClinVar: NM\_004972.3(*JAK2*): c.1849G>T (p. V617F)]. Pelo fato de constituir uma substituição de bases, *JAK2V617F* gera uma consequência funcional de tipo *missense* com apresentação de alelos T/A, mencionando que o alelo G é o alelo ancestral.

Atualmente, *JAK2V617F* é considerada a alteração molecular mais frequente nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR/ABL1* negativo, detectando-se em > 95% de pacientes com PV e de 50 a 60% em pacientes com TE e MF, respectivamente<sup>5,40,58</sup>. Portanto, a OMS contempla sua detecção como um critério diagnóstico maior nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR/ABL1* negativo<sup>1,90</sup>. Assim, a variante *JAK2V617F* apresenta um padrão autossômico dominante com penetrância incompleta<sup>91</sup>, vinculada ao fenômeno de dissomia uniparental<sup>92</sup>.

A dissomia uniparental<sup>1</sup> favorece a perda de heterozigose no processo de recombinação mitótica por deleção de material cromossômico em um alelo (e consequente expressão exclusiva do alelo restante) ou por duplicação da região cromossômica materna ou paterna e concorrente perda do outro alelo<sup>7,33</sup>. A penetrância variável de *JAK2V617F* na recombinação mitótica contribui a sua aparição em certos casos familiares de NMP<sup>56,93</sup>; fato pelo qual análise de hematopoiese clonal em famílias com indivíduos diagnosticados com NMP, permitiria detectar indivíduos em fase precoce da doença ou bem, identificar possíveis indivíduos portadores silenciosos<sup>94</sup>. Contudo, algumas pesquisas apontam que *JAK2V617F* não constitui uma variante de herança congênita e primária; e portanto, é desvinculada a herança familiar<sup>47,56,95</sup>.

---

<sup>1</sup> Dissomia Uniparental refere ao distúrbio genético no qual o indivíduo herda duas cópias cromossômicas ou partes cromossômicas de um único genitor. Nussbaum, R.; McInnes, R.; Willard, H. Thompson & Thompson Genética Médica. Ed 8. 2018.

A Hematopoiese clonal é denominada como um processo natural que não só abrange o tecido sanguíneo e que refere o resultado de competição de clones na medula óssea, em um tempo indeterminado<sup>3</sup>. O processo de expansão de clones neoplásicos é uma questão não tão bem esclarecida que, segundo pesquisas é atribuído à acumulação de outras variantes somáticas como resultado de processos celulares intrínsecos modificados e exposição a agentes mutagênicos externos<sup>6,59,96,97</sup>. Além da acumulação de variantes genéticas, fatores naturais como idade e o microambiente da medula óssea desempenham um papel crucial no risco de desenvolvimento de NMP<sup>59,70,98</sup>. Contudo, 10% de indivíduos maiores de 65 anos, inclusive da população saudável, possuem mutações em genes somáticos sem manifestação de quadro clínico e morfológico de NMP, fenômeno denominado Hematopoiese Clonal de Potencial Indeterminado (HCPI)<sup>81,96</sup>.

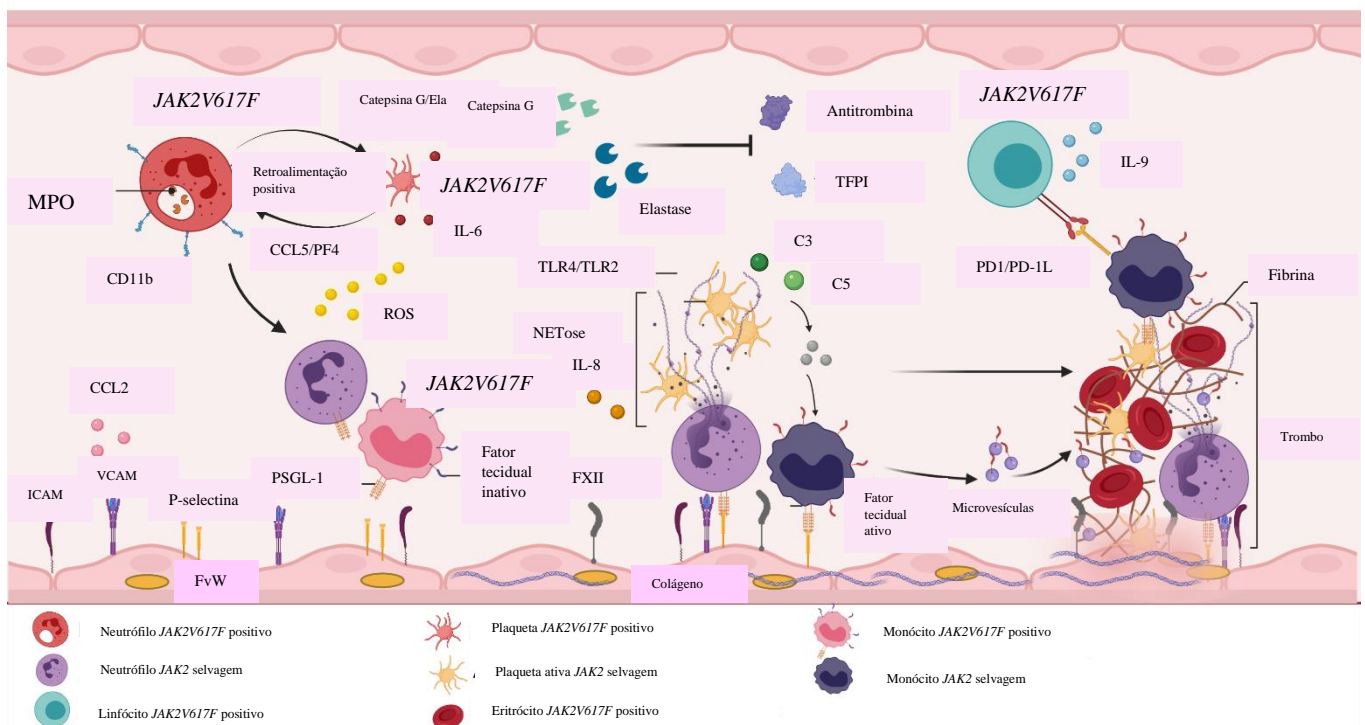
Castiglione e colaboradores, no ano 2019 realizaram ensaios de análise de células do estroma e observaram que células *JAK2V617F* positivas transplantadas em um estroma com células tipo selvagem tiveram menor replicação que aquelas transplantadas em um “nicho” medular com células *JAK2V617F* positivas, as quais mostraram 2 vezes mais níveis de replicação no microambiente<sup>97</sup>. Igualmente, eles detectaram altas concentrações de CXCL12 (Quimiona de Ligando 12, importante no processo de restauração endotelial e presente na maioria dos tecidos) nos nichos com células *JAK2V617F* positivas o que favorece à reposição do microambiente com células mutadas e permitindo a expansão de clones malignos<sup>97</sup>.

Em contrapartida, Challen e colaboradores em 2020 revelaram que *JAK2V617F* reduz a capacidade de auto-renovação de células estaminais levando a expansão de células progenitoras mutadas, o que incrementa a acumulação de mutações e progressão da doença<sup>3</sup>. Esses achados vinculam-se aos encontrados por Nienhold e colaboradores em 2020, que encontraram alta frequência alélica da mutação *JAK2V617F* em células do sangue periférico, especialmente em plaquetas e reticulócitos<sup>99</sup>, considerando que as plaquetas derivam dos megacariócitos e estes últimos expressam CXCL4, (Quimiocina de Ligando 4, detectada nas Neoplasias Mieloproliferativas crônicas e relacionada ao desenvolvimento de inflamação)<sup>100</sup>.

A inflamação é uma das principais respostas nas malignidades hematológicas, associadas a mielofibrose<sup>101</sup>, observando-se que em indivíduos com NMP são detectadas altas concentrações de citocinas pro-inflamatórias, as quais tem demonstrado expansão preferencial de clones *JAK2V617F* positivos<sup>59</sup>. Quadros inflamatórios crônicos podem levar a hipóxia de severidade variável, danificando tecidos e incrementando a produção de progenitores eritróides e conseqüentemente, elevando a massa eritrocitária para suprir a oxigenação celular e tecidual.

A hipóxia gerada leva a direta produção de citocinas no sangue periférico, mediante ativação das vias do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), JAK1/STAT1/JAK2/STAT5 e PI3K/AKT1 que estimulam ativação do Fator Induzível de Hipóxia Classe 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ )<sup>31</sup>

Por outro lado, conhece-se que a secreção de interleucinas e moléculas inflamatórias por células *JAK2V617F* positivas contribui na interação intercelular, dano endotelial e desenvolvimento de imunotrombose<sup>102,103</sup>, termo atribuído à alteração da resposta imune e da hemostasia. Interação plaquetas/neutrófilos/monócitos *JAK2V617F* positivos constitui o principal foco de produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e consequente imunotrombose<sup>104,105</sup>, achado que conduz à execução de pesquisas que avaliem o papel destas células na evolução de estados inflamatórios nas NMP (**Figura 4**).



**Figura 4.** Desenvolvimento de imunotrombose nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas.  
**Fonte:** G Torres D e colaboradores (2022)<sup>74</sup>

É bem documentado que aproximadamente 20 genes ligados à regulação epigenética (*TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*) e genes ligados a *RNA-splicing* (*U2AF1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*)<sup>3,106</sup> estão implicados na hematopoiese clonal<sup>83,107</sup>, sendo que variantes em *TET2* e *DNMT3A* podem conduzir a expressão de clones portadores de outras variantes, como *JAK2V617F*<sup>59</sup>. Variantes em *TET2* observam-se em aproximadamente 22% dos casos de NMP,

ressaltando que alterações neste gene marcam o impacto clínico em pacientes *JAK2V617F* positivos, pois indivíduos com alterações em *TET2* posteriores a *JAK2V617F* manifestam um curso clínico mais severo do que aqueles com apresentação inicial de mutações em *TET2*<sup>108,109</sup>. Alterações genéticas em *DNMT3A* são encontradas em até 10% de pacientes com NMP, atribuídas a estágios acelerados de NMP<sup>3,108</sup>.

Além da pesquisa de variantes em genes envolvidos no processo de regulação epigenética e *RNA-splicing*, variantes em reguladores negativos da via JAK/STAT como *SOCS*, *CBL*, *SH2B3* devem ser investigadas, pois elas podem estar presentes em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas, especialmente em indivíduos triplo negativos<sup>30,110</sup>.

### 1.5.2. Variantes no éxon 12 do gene *JAK2*

As variantes genéticas do éxon 12 são classificadas em três grupos: substituições de Leucina por Lisina na posição 539, deleções de ácido glutâmico na posição 543 e duplicações de aminoácidos envolvendo substituição de Fenilalanina na posição 547<sup>111,112</sup>. Pela diversidade de variantes neste éxon, técnicas de sequenciamento de genoma e exoma são utilizadas, citando-se atualmente mais de 37 variantes, entre as mais frequentes: N542- E543del (23%), E543-D544del (11%), F537-K539delinsL e K539L (10%), e R541- E543delinsK (8%)<sup>113</sup>.

Aproximadamente 3% de indivíduos com PV *JAK2V617F* negativos possuem variantes no éxon 12<sup>19</sup>, descritas como um conjunto de variantes heterogêneas que incluem inserções/deleções e em menor frequência duplicações<sup>19</sup>.

Chang-Hun Park e colaboradores, avaliaram por Sequenciamento de Sanger 42 indivíduos com diagnóstico de PV, sendo as variantes K539L e N542\_E543 as de maior frequência e de forma interessante, detectadas em indivíduos mais jovens, com eritrocitose predominante sem hiperplasia concorrente de megacariócitos e granulócitos como visto em indivíduos *JAK2V617F* positivos<sup>112</sup>.

Em contraste, Passamonti F e colaboradores, em seu estudo realizado no 2011, encontraram que de 106 indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas, 17 indivíduos apresentaram variantes no éxon 12, nomeando que 2/3 manifestaram eritrocitose isolada, alta concentração de hemoglobina, alta contagem de eritrócitos e reticulócitos, baixa contagem plaquetária e leucocitária e nula diferença significativa na idade e no sexo comparado com aqueles que foram *JAK2V617F* positivos<sup>114</sup>.



A eritrocitose absoluta vista em ambas pesquisas, relaciona-se com o achado de Scott L. e colaboradores no ano 2007, que mediante transfecção de células BaF3/EpoR com diferentes variantes génicas em ausência de eritropoietina, observaram incremento significativo nos níveis de fosforilação de JAK2 e STAT5 e uma ativação constitutiva da via Ras/Erk/MAPK provocando níveis de fosforilação de quinase regulada por sinais extracelulares 1 e 2 (Erk1 e 2) muito mais elevados comparado com indivíduos *JAK2V617F* positivos<sup>21</sup>.

A eritrocitose pura nas neoplasias mieloproliferativas crônicas associa-se a desregulação do metabolismo do ferro que envolve desregulação da hepcidina<sup>115</sup>. A EPO estimula a síntese do regulador eritróide em eritroblastos: Eritroferrona (ERFE), regulador da hepcidina. Assim, Grisouard. J e colaboradores, no ano 2016, demonstraram mediante ensaios em murinos que progenitores eritróides expressam alta concentração de ERFE e baixa hepcidina, o que induz elevada Transferrina (TRF1) e resulta em um estado de reabsorção facilitado do ferro no intestino e redistribuição do ferro em áreas hematopoiéticas, favorecendo a eritropoiese hiperativa encontrada em mutações no éxon 12 do gene *JAK2*<sup>116</sup>.

Apesar de que esses quadros de eritrocitose são manifestados em indivíduos *JAK2V617F* positivos ou com variantes no éxon 12, alguns pacientes podem manifestar ambas variantes, coexistindo como 2 clones separados<sup>114</sup>. Estado de homozigidade para variantes no éxon 12 é menos frequente comparado com indivíduos *JAK2V617F* positivos, sugerindo que a recombinação mitótica é um evento mais característico de PV *JAK2V617F* positivo<sup>117,118</sup>.

Igualmente, aberrações no cariótipo destes indivíduos não tem sido descritas, mas a presença do haplótipo *JAK2* GGCC ou 46/1 é vinculado como *background* genético para o desenvolvimento de *JAK2V617F* e variantes no éxon 12<sup>114</sup>. O haplótipo *JAK2* 46/1 consiste na troca de 2 Timinas e uma Citocina por 2 Guaninas e 2 Citocinas em uma região de 250-280 kb do cromossomo 9p, que atinge os genes *JAK2*, *INSL6* e *INSL4*; descrito como uma condição germinativa herdada que confere disposição ao desenvolvimento de NMP<sup>119,120</sup>.

### 1.5.3. Outras variantes detectadas no gene *JAK2* envolvidas nas NMP.

Apesar de que a detecção da variante *JAK2V617F* ou no éxon 12 de *JAK2* constitui um critério diagnóstico maior nas neoplasias mieloproliferativas crônicas, existem publicações que demonstram a existência de outras variantes localizadas em outros éxons de *JAK2* em pacientes com NMP<sup>27,121</sup>, o que sugere uma grande necessidade de estender as pesquisas moleculares em

outras regiões do gene, especialmente na região codificante. Mediante estudos de sequenciamento de Sanger e Sequenciamento de Nova Geração (NGS- *Next Generation Sequencing*) novas variantes em *JAK2* tem sido identificadas, a maioria delas de tipo sinônimo e *missense*, afetando outras regiões da proteína que, igual do que o domínio pseudoquinase, conduzem à perda da função regulatória de *JAK2*<sup>24,25</sup>. Assim, o emprego destas técnicas moleculares, tem permitido identificar e descrever novas variantes nos éxons 6<sup>26</sup>, 9-10<sup>27</sup> 11-15<sup>23</sup>, e 19<sup>28</sup> que, segundo estudos, apresentam associação a transformação leucêmica e desenvolvimento de tumores sólidos não hematológicos<sup>27,28,29,71</sup>. De igual modo, variantes de tipo *missense* na região de ligação entre SH2-JH2 tem sido reportadas em muitos casos de PV<sup>71</sup>.

Maslah e colaboradores descrevem 2 casos de interesse mediante o uso de NGS: um paciente carregando substituições na posição 1848 e 1849 que codificou p.V617F, e outro indivíduo que apresentou a substituição c.1849G>T em coexistência de c.1860C>A. Além disso, identificou-se a variante p.H345L, localizada no domínio FERM, região essencial no reconhecimento do ligando e ativação do receptor, o que impacta na sinalização celular, podendo-se converter em um novo alvo de pesquisa dentro de *JAK2*<sup>24</sup>.

Indistintamente, Sokol e colaboradores descrevem a variação de um único nucleotídeo (SNV) *rs2230722*, descrito como c.489C>T, que corresponde a uma variante benigna de tipo silenciosa, codificante do aminoácido Histidina e localizada no domínio FERM da proteína *JAK2*, cuja variante apresentou maior frequência em mulheres com Síndrome de agregação plaquetária comparado com homens; significativamente associado à trombose venosa profunda<sup>26</sup>. Villanueva e colaboradores também descrevem uma nova variante no domínio FERM de *JAK2*, descrita como c.1690C > T, p.(R564\*) localizada no éxon 13 e categorizada como germinativa com ganho de função<sup>22</sup>.

O SNV *rs2230724* está associado a cânceres sólidos<sup>71</sup>, exemplo disso é o estudo de Carvalho e colaboradores que encontrou 4 SNV's em *JAK2*: *rs10429491*, 489 C>T; *rs2230723*, 1177 C>G (produzindo leitura de L>V); *rs2230724*, 2490 G>A e *rs41316003*, 3188 G>A (produzindo a substituição de uma A>H); associados a carcinoma escamoso de cabeça pescoço<sup>29</sup>. No entanto, existem outros SNV's avaliados em indivíduos com NMP, entre eles: *rs55953208*, *rs2230727* e *rs2230728*<sup>27</sup>.

Por outro lado, o SNV *rs10758669* de *JAK2* consiste na substituição de uma A>C, associado a incrementada permeabilidade intestinal, fato que poderia funcionar como mecanismo de contribuição ao desenvolvimento da patogênese de doença de Crohn. Contudo,

esse mecanismo ainda deve ser esclarecido<sup>122</sup> e poderia tornar o gene *JAK2* como um potencial alvo de pesquisa tanto nos cânceres líquidos como nos tumores sólidos.

A respeito da frequência investigativa acerca do perfil molecular e hematológico de indivíduos com Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo, somente alguns estados brasileiros como São Paulo, Santa Catarina e Pernambuco registram altos números de publicações sobre estas doenças hematológicas; entretanto, na região Amazônica não existem pesquisas referentes à descrição de variantes na região codificante do gene *JAK2* em pacientes com as doenças hematológicas em questão, o que indica a necessidade de impulsar novas pesquisas que permitam encontrar respostas sobre os mecanismos desencadeantes destas doenças e diretamente, conhecer o perfil mutacional do gene na população Amazonense.

Por tanto, o presente trabalho visa caracterizar molecularmente variantes no gene *JAK2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo, pois além de tratar-se de um trabalho pioneiro na região, contribuiu na estimação da frequência de variantes genéticas nos indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas da zona. De igual forma, o rastreamento de outras variantes não comumente descritas nas neoplasias mieloproliferativas crônicas permite compreender achados hematológicos e moleculares, que poderiam inclusive influir no histórico clínico dos indivíduos. Desta forma, esta investigação aporta na abordagem de novas linhas de estudo do gene, destacando tópicos relacionados ao mecanismo molecular e funcional destas variantes em coexistência com outras variantes gênicas, à desregulação do sistema imune e avaliação de hematopoiese clonal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Caracterizar molecularmente variantes no gene *JAK2* em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo.

### 2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Descrever as variantes encontradas na região codificante do gene *JAK2* em pacientes diagnosticados com doenças mieloproliferativas *BCR/ABL1* negativas,
- 2.2.2. Descrever a frequência das variantes encontradas na região codificante do gene *JAK2* em pacientes diagnosticados com doenças mieloproliferativas *BCR/ABL1* negativas,
- 2.2.3. Traçar o perfil genético dos indivíduos diagnosticados com doenças mieloproliferativas *BCR/ABL1* negativas com variantes no *JAK2*,
- 2.2.4. Descrever associação do perfil clínico-laboratorial dos pacientes diagnosticados com doenças mieloproliferativas *BCR/ABL1* negativas com variantes no *JAK2*.

### 3. METODOLOGIA

O presente estudo é Descritivo-Analítico transversal.

#### 3.1. Área de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Manaus-Amazonas, desenvolvido no Laboratório de Genômica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

#### 3.2. População de estudo

A população de estudo foi constituída de indivíduos que demandaram atendimento espontâneo na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), no período de julho/2021 a fevereiro/2022, com diagnóstico clínico de neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo: policitemia vera (PV: CID 45), trombocitemia essencial (TE: CID 47.3) e mielofibrose (MF: CID 94.5).

De acordo com os dados registrados no sistema iDOCTOR até Fevereiro/2022, o total de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo, atendidos na FHEMOAM foi de 152 casos. Destes, 75 amostras foram viáveis para o desenvolvimento da metodologia do estudo, distribuídas em 29 casos de policitemia vera, 44 casos de trombocitemia essencial e 02 casos de mielofibrose.

#### 3.3. Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão

Foram avaliadas 75 amostras provenientes de pacientes com diagnóstico de PV, TE e MF (segundo as diretrizes da OMS 2016); de ambos os sexos, maiores de 18 anos que procuraram atendimento espontâneo na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), que mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) decidiram participar da pesquisa.

Foram incluídos na pesquisa indivíduos com teste *BCR/ABL1* negativo, com recebimento ou não de terapia citorrredutora e disponibilidade de acesso aos prontuários para caracterização clínica da doença. Os pacientes incluídos no estudo foram captados do Sistema de Atendimento Médico e Estatístico (SAME) e sistema iDoctor.

Foram excluídos pacientes com amostras insuficientes para análise, amostras com má qualidade após extração de material genético e após purificação de material amplificado. Também foram excluídos pacientes que não apresentaram dados suficientes nos prontuários para caracterização clínica da doença.

### **3.4. Aspectos éticos**

O projeto foi executado de acordo às normativas estabelecidas na resolução 466/12 e avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. O projeto faz parte de um projeto maior intitulado: “Caracterização molecular de pacientes com neoplasias Mieloproliferativas crônicas, cujo número de parecer é: 4.450.813. CAAE: 39991420.6.0000.0009 (aprovado 09 de dezembro, 2020).

O estudo utilizou dados clínicos, laboratoriais e dados obtidos de testes moleculares, informações que foram protegidas por anonimato no desenvolvimento da pesquisa toda; e somente utilizada para fins investigativos.

### **3.5. Coleta de dados clínicos e laboratoriais**

Os dados clínicos dos pacientes foram coletados dos prontuários médicos eletrônicos (sistema iDoctor). Entre as características demográficas e clínicas avaliadas foram: sexo, idade, presença de esplenomegalia, manifestação de eventos cardiovasculares, trombóticos ou hemorrágicos, terapia utilizada para controle da clínica. Os dados laboratoriais foram obtidos a partir de coletas de extração sanguínea para avaliação de parâmetros hematológicos, hemostáticos e bioquímicos.

### **3.6. Coleta das amostras**

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubos com sistema a vácuo. Foram coletados de 4 a 5 tubos por paciente com a seguinte ordem: um tubo com gel separador de soro (*BD Vacutainer® SST<sup>TM</sup>*) para determinações bioquímicas, outro tubo *LABOR IMPORT®* com citrato de sódio 3,2% para testes hemostáticos, e dois ou três com ácido etilendiamino tetracético - EDTA- (*INJEX VÁCUO® EDTA K3*) para determinação de parâmetros hematológicos e para realização de testes moleculares.

### **3.7. Análises da Hemostasia**

As amostras coletadas no tubo com citrato de sódio foram centrifugadas por 15 min a 3,000 r.p.m. O plasma obtido analisou-se para determinação do perfil hemostático, com a finalidade de associar a manifestação de eventos hemorrágicos ou trombóticos através de valores do Tempo de Protrombina- Razão Internacional Normalizada (TP-INR), Tempo de Tromboplastina parcial ativada (TTPa) e fibrinogênio. Para avaliação dos parâmetros da coagulação utilizou-se o equipamento ACL TOP 300.

### **3.8. Análises Bioquímicas.**

As amostras coletadas no tubo com gel separador foram centrifugadas por 5 min a 3,500 r.p.m. O soro obtido analisou-se para determinação de Lactato Desidrogenase (DHL) e Ácido Úrico, com a finalidade de associar possíveis achados moleculares com estado hipermetabólico nos pacientes. Para determinações bioquímicas utilizou-se o equipamento Bioclin 3000, de acordo às instruções do fabricante.

### **3.9. Análises Hematológicas**

Uma das amostras coletadas no tubo com EDTA utilizou-se para avaliação de parâmetros hematológicos vinculados à clínica das neoplasias mieloproliferativas crônicas. Entre os parâmetros avaliados citam-se: Contagem de eritrócitos (RBC), Hematócrito (Hto), Hemoglobina (Hba), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Contagem de leucócitos (WBC), percentual de neutrófilos segmentados, monócitos e linfócitos. Para avaliação destes parâmetros utilizou-se o equipamento Siemens ADVIA 2120i.

### **3.10. Análise molecular para detecção de variantes na região codificante do gene *JAK2***

#### **3.10.1. Extração de RNA**

Extração de RNA total foi realizada com reagente Trizol®, seguindo os passos estabelecidos no Procedimento Operacional Padronizado de extração de RNA do LabGen-HEMOAM (ver anexo 7.4). A concentração de RNA total extraído foi determinada pelo espectrofotômetro *Nanodrop modelo 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA)*, estabelecendo como valor de concentração aceitável um valor > 80 ng/uL. A qualidade do RNA foi determinada pelas relações 260/280 e 260/230, estabelecendo um valor > 1,8 como parâmetro de pureza e qualidade aceitável. Além disso, a qualidade do RNA extraído foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose ao 0,8% corado com brometo de etídio.

### 3.10.2. Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA utilizou-se o kit SuperScript III Transcriptase Reversa® (Promega, Inc.); seguindo as instruções do Procedimento Operacional Padronizado do LabGen-HEMOAM (ver anexo 7.5). O mix conteve por reação 4,0 uL de Buffer 5X, 1,7 uL de MgCl<sub>2</sub> [25 mM], 1,0 uL de PCR *nucleotide mix*, 0,12 de RNAsin, 1,0 uL de enzima Retrotranscriptase e 2,5 uL de RNA extraído. Em amostras que apresentaram quantificação entre a faixa de 50-80 ng/uL, utilizaram-se 5 uL de RNA extraído.

Em seguida, o mix submeteu-se a uma Reação em cadeia da polimerase – Retrotranscriptase (RT-PCR) para síntese de cDNA, utilizando os seguintes parâmetros de ciclagem: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e tempo indefinido a 4°C. Após reação, o cDNA foi armazenado a -80°C até realização de PCR convencional.

### 3.10.3. Reação em Cadeia da Polimerase

Amplificação de cDNA foi realizada por Reação em cadeia da polimerase convencional utilizando o equipamento ABI *Applied Biosystems Veriti*™. Foram realizadas 3 reações em cadeia da polimerase por amostra para obter fragmentos de tamanho viável para sequenciamento de Sanger e dar cobertura a toda a região codificante de *JAK2*. Os iniciadores utilizados nas reações foram desenhados utilizando as ferramentas Primer-BLAST- NCBI e OligoAnalyzer Tool-IDTDNA.com, avaliando a porcentagem de GC, T<sub>m</sub>, capacidade de *Hairpin*, e índice  $\Delta G$ . Os iniciadores usados são descritos no **quadro 6**.

**Quadro 6.** Iniciadores usados na reação em cadeia da polimerase.

Número de PCR	Nome	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto
região 5' de CDS	F1	GGC AAC AGG AAC AAG ATG TGA A	1359 pb
	R1340	TCC AGT CTG ATT ACC TGC TT	
região intermédia de CDS	Fow1325	CCC AAT TTC GAT GGA TTT TGC CA	1415 pb
	R2696	GTC CTG TAG AGG GTC ATA CC	
região 3' de CDS	F2715	GGT ATG ACCC CTC TAC AGG AC	830 pb
	R1_3503	TTG GTC TCA GAA TGA AGG TC	

CDS: sequência codificante.



As ampliações foram realizadas utilizando um volume de 25  $\mu$ L, sendo que o mix de conteve por reação: > 80 ng/uL de cDNA, tampão de PCR 1X, dNTP [0,2 mM] e 1U Taq DNA polimerase. Para amplificação dos fragmentos, utilizaram-se as programações descritas no **quadro 7**. Todos os produtos das reações foram visualizados mediante eletroforese em gel de agarose ao 1,5% corado com brometo de etídio.

**Quadro 7.** Programações de ciclagens para amplificação de fragmentos

CDS: Sequência codificante.

	<b>Região 5' de CDS</b>	<b>Região intermédia de CDS</b>	<b>Região 3' de CDS</b>
Desnaturação inicial	94°C/5 minutos	94°C/5 minutos	94°C/5 minutos
Desnaturação no ciclo	94°C/30 segundos/35 ciclos	94°C/30 segundos/35 ciclos	94°C/30 segundos/35 ciclos
Temperatura do primer	63°C/30 segundos/35 ciclos	63°C/30 segundos/35 ciclos	59°C/30 segundos/35 ciclos
Extensão	72°C/1 minuto, 45 segundos/35 ciclos	72°C/1 minuto, 45 segundos/35 ciclos	72°C/1 minuto/35 ciclos
Extensão final	72°C/7 minutos	72°C/7 minutos	72°C/7 minutos
Concentração do MgCl <sub>2</sub> (mM)	2,5	1,5	2,5
Volume de cDNA no mix (uL)	3	3	3

### 3.10.4. Reação de Sequenciamento de Sanger

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o protocolo de purificação e precipitação de DNA por Polietilenglicol (8000, *Promega*)<sup>123,124,125</sup>. Reação de sequenciamento (em ambas direções) foi realizado usando BigDye® Terminator v3.1 (*Applied Biosystems*), Tampão 5X, iniciadores [3.3 Mm] e 20-35 ng/uL do produto purificado. Os iniciadores utilizados no sequenciamento são descritos no **quadro 8**. Os primers do sequenciamento também foram desenhados utilizando as ferramentas Primer-BLAST- NCBI e OligoAnalyzer Tool-IDTDNA.com, avaliando a porcentagem de GC, Tm, capacidade de *Hairpin*, e índice  $\Delta G$ , com a finalidade de flanquear toda a região codificante de *JAK2* (que abrange desde o éxon 3 até o éxon 25).

**Quadro 8.** Iniciadores utilizados na Reação de Sequenciamento, para detecção de variantes na região codificante de *JAK2*.

<i>Primer</i>	<i>Identificação dos Primers</i>	<i>Sequências 5' → 3'</i>
1	JAK2_F_1	GGC AAC AGG AAC AAG ATG TGA A
2	JAK2_Rev_691	AGC TGA TAG AGT TAT AGA TGG C
3	JAK2_F_691	AAA CGA TCA AAC CCC ACT GG
4	JAK2_Fow_1325	CCC AAT TTC GAT GGA TTT TGC CA
5	JAK2_Rev_1340	TCC AGT CTG ATT ACC TGC TT
6	JAK2_F_1981	ATT CTG GTT CAG GAG TTT G
7	JAK2_R_1963	CAA ACT CCT GAA CCA GAA T
8	JAK2_F_2715	GGT ATG ACCC CTC TAC AGG AC
9	JAK2_R_2696	GTC CTG TAG AGG GTC ATA CC
10	JAK_R1_3503	TTG GTC TCA GAA TGA AGG TC
11	JAK2-Confirmação	AGT GGT CCT TCA GGT GAG GAG

Os produtos provenientes da reação de sequenciamento foram purificados mediante o protocolo de EDTA/Etanol (*Applied BioSystems, USA*), para ser posteriormente avaliados no sequenciador automático 3500 XL *Genetic Analyzer*® (*Applied BioSystems, USA*). As sequências obtidas analisaram-se mediante o *software* Geneious 6.0.6 (*Biomatters, USA*), alinhadas e comparadas com a sequência de referência *Homo sapiens* Janus kinase 2 (*JAK2*), transcrito 2, mRNA (NCBI: NM\_001322194.2). Amostras com presença de variantes muito raras foram sequenciadas e confirmadas duas vezes.

### 3.11. Análise estatística

As características clínicas e laboratoriais dos indivíduos do estudo foram apresentadas em formas de tabelas, elaboradas com o programa Excel 2013 (*Microsoft Office. 2013*). Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%) e variáveis numéricas foram expressas por mediana e intervalo interquartil [IIQ]. Distribuição de variáveis numéricas contínuas foi conferida mediante teste de Shapiro-Wilk. Análise estatística de variáveis categóricas foi realizada pelo teste Qui-Quadrado. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para análise de variáveis numéricas, quando for conveniente. Valores de  $p < 0.05$  consideraram-se estatisticamente significativos. Análise estatística convencional dos dados realizou-se através do software *GraphPad Prism v.8.2.1*.

### 3.12. Equipe do Projeto

	<b>Integrantes do projeto</b>	<b>Categoria</b>	<b>Instituição</b>	<b>Formação</b>	<b>Função no projeto</b>
01	Andréa Monteiro Tarragô	Doutora	UFAM/ HEMOAM	Farmacêutica -Bioquímica	Orientadora
02	Lucivana de S. Mourão	Doutora	UEA/HEMOAM	Bióloga	Coorientadora
03	George Villarouco da Silva	Doutor	FIOCRUZ/FCECON	Biólogo	Colaborador
04	Nelson Abrahim Fraiji	Doutor	HEMOAM	Médico	Colaborador
05	Adriana Malheiro	Doutora	HEMOAM	Bióloga	Colaboradora
06	Allyson G. da Costa	Doutor	UFAM/HEMOAM	Enfermeiro	Colaborador
07	Wanessa Horreda Laranjeira	Graduanda	FAMETRO	Biomédica	Colaboradora
08	Manuela Vitória Alves	Mestranda	UEA/HEMOAM	Biomédica	Colaboradora
09	Miliane Araújo	Mestranda	UEA/HEMOAM	Biomédica	Colaboradora
10	Jhemerson Paes	Mestrando	UEA/HEMOAM	Biomédico	Colaborador
11	Érika Alves	Mestranda	UEA/HEMOAM	Farmacêutica -Bioquímica	Colaboradora
12	Deborah Canté	Mestranda	UEA/HEMOAM	Bióloga	Colaboradora
13	Dania Gutiérrez Torres	Mestranda	UEA/HEMOAM	Biomédica	Aluna do mestrado responsável pelo projeto

### **3.13. Financiamento e infraestrutura**

O projeto possui financiamento próprio e foi realizado nos laboratórios Multidisciplinar de Pesquisa e Laboratório de Genômica (HEMOAM). Leituras de Sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Genômica no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Estado do Amazonas (UFAM) e da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AM).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Capítulo I:

#### ***JAK2* Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms**

Artigo de revisão publicado na revista *Biomolecules* 12(2): 291

DOI: 10.3390/biom12020291

(ISSN 2218-273X)

Fator de Impacto: 4.87

Qualis CAPES A1



Review

## **JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms**

**Dania G. Torres**<sup>1</sup>, Jhemerson Paes<sup>1</sup>, Allyson G. da Costa<sup>1,2</sup>, Adriana Malheiro<sup>1,2</sup>, George V. Silva<sup>1,3,4</sup>, Lucivana P. de Souza Mourão<sup>1,\*</sup> and Andréa M. Tarragô<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM 69850-000, Brazil; dgotorr@gmail.com (D.G.T.); jhemersonpaes@gmail.com (J.P.); allyson.gui.costa@gmail.com (A.G.d.C.); malheiroadriana@yahoo.com (A.M.); georgevillarouco@hotmail.com (G.V.S.)

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM 69067-005, Brazil

<sup>3</sup> Fundação Oswaldo Cruz–Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz), Manaus, AM 69027-070, Brazil

<sup>4</sup> Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), Manaus, AM 69040-010, Brazil

<sup>5</sup> Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), Manaus, AM 69050-001, Brazil

\* Correspondence: andrea\_s\_monteiro@hotmail.com (A.M.T.); lpsouza@uea.edu.br (L.P.d.S.M)

**Abstract:** The *JAK2V617F* variant constitutes a genetic alteration of higher frequency in BCR/ABL1 negative chronic myeloproliferative neoplasms, which is caused by a substitution of a G >T at position 1849 and results in the substitution of valine with phenylalanine at codon 617 of the polypeptide chain. Clinical, morphological and molecular genetic features define the diagnosis criteria of polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. Currently, *JAK2V617F* is associated with clonal hematopoiesis, genomic instability, dysregulations in hemostasis and immune response. *JAK2V617F* clones induce an inflammatory immune response and lead to a process of immunothrombosis. Recent research has shown great interest in trying to understand the mechanisms associated with *JAK2V617F* signaling and activation of cellular and molecular responses that progressively contribute to the development of inflammatory and vascular conditions in association with chronic myeloproliferative neoplasms. Thus, the aim of this review is to describe the main genetic, hematological and immunological findings that are linked to JAK2 variant signaling in chronic myeloproliferative neoplasms.

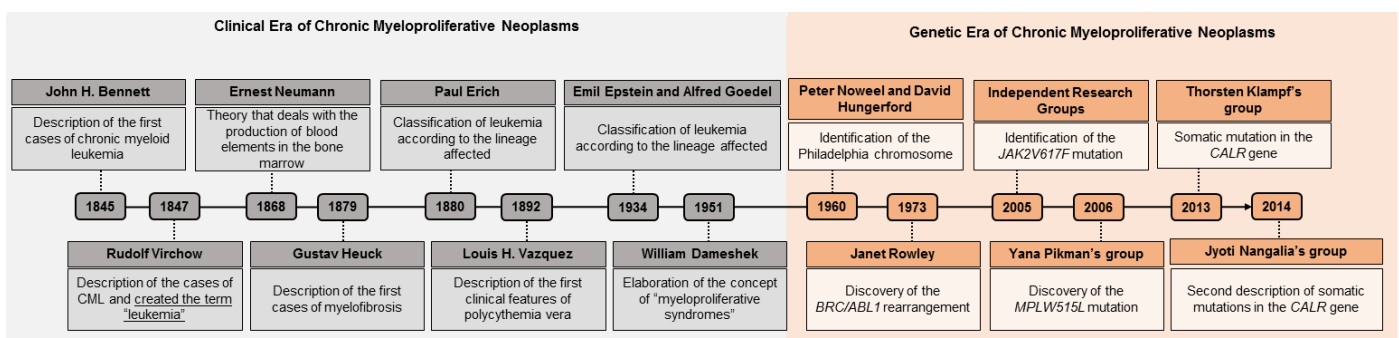
**Keywords:** *JAK2V617F* signaling; myeloproliferative neoplasms; clonal hematopoiesis; hemostasis; immunothrombosis; immune response

## 1. Introduction

Chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal pathologies of hematopoietic stem cells [1], which are characterized by medullar hyperplasia and an accumulation of elements of the myeloid series, and present progressive and effective maturation [2], though without affecting the maturation and differentiation process of the erythroid, granulocytic and megakaryocytic lineage [3]. These changes lead to peripheral blood leukocytosis, increased erythrocyte mass, thrombocytosis and, in more severe cases, medullary fibrosis or leukemic transformation [2].

The first studies on MPNs date from 1845, starting with the description of the first case of chronic myeloid leukemia [4]. Since then, several scholars have engaged in the analysis of the molecular mechanism of chronic myeloproliferative neoplasms, and have determined the semiological aspects of these hematological diseases by observing the signs, symptoms and clinical findings of the investigated patients [5–7].

This clinical view gained a new ally in 1960 with the discovery of the Philadelphia chromosome, which was the first association between a chromosomal abnormality and an oncological disease to be described in the history of medicine [3–4,8–9]. Since this discovery, the history of MPNs shows them to enter the era of genetics, during which more studies began to be developed and genetic research gained further space in the diagnosis of MPNs (Figure 1).



**Figura 1.** Timeline of myeloproliferative neoplasms. In gray, the clinical era of the MPNs can be seen, which is based on semiological aspects. In orange, the genetic era of MPNs is highlighted, since associated genetic research made it possible to identify genetic alterations that are markers of some MPNs, an important factor that supports diagnosis. CML: chronic myeloid leukemia; BCR/ABL: BCR/ABL genetic rearrangement.

Thus, with the discoveries of molecular mechanisms involved in MPNs, the World Health Organization (WHO) determined clinical and laboratory parameters for



establishing the diagnosis of these diseases and the WHO, according to its last review in 2016, classifies chronic myeloid neoplasms according to the presence or absence of the Philadelphia chromosome (BCR/ABL1 fusion gene) [10,11]. In the BCR/ABL1 positive MPN classification, chronic myeloid leukemia (CML) is responsible for 15–20% of leukemias worldwide, with an incidence of 1–2/100,000. CML is characterized by the presence of a left shift in granulocytes that results in the identification of less than 20% of the blasts in peripheral blood [4,10].

Unlike CML (single BCR/ABL1 positive entity, according to the WHO), diseases belonging to the group of BCR/ABL1 negative MPNs have been described, including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), primary myelofibrosis (PMF), chronic neutrophilic leukemia (CNL), chronic eosinophilic leukemia (CEL) and unclassifiable myeloproliferative neoplasms [10,11]. However, polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis are the most frequent diseases in this group [10,12–13], with PMF having the worst prognosis of the three myeloproliferative disorders [12,14]. Similar to CML, in the BCR/ABL1 negative MPNs, criteria are established based on genetic, hematologic and clinical findings, which are organized in the form of major and minor criteria for the diagnosis of PV, ET and PMF, as shown in .

**Quadro 1.** Diagnosis criteria for classic BCR/ABL1 negative chronic myeloproliferative neoplasms.

Neoplasm	Clinical Description	Major Diagnostic Criteria	Minor Diagnostic Criteria
PV	Exacerbated increase in erythrocyte mass (total red blood cell count). Generally, both genders are diagnosed in the 6th or 7th decade of life [11]. Annual global incidence is 0.3–1.5/100,000 and survival rate is 15 years [2].	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hb: &gt;16.5g/dL for men (or Hct: &gt;49%), &gt;16.0g/dL for women (or Hct: &gt;48% women), or &gt;25% increase in red cell mass [2];</li> <li>Bone marrow biopsy demonstrates panmyelosis with pleomorphic mature megakaryocytes;</li> <li>Presence of the <i>JAK2V617F</i> mutation or mutations in exon 12 of the <i>JAK2</i> gene.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduced serum erythropoietin concentration [10].</li> </ul>
ET	Increased platelet count with megakaryocytic hyperplasia. Annual global incidence is	<ul style="list-style-type: none"> <li>Platelet count <math>\geq 450 \times 10^3/\text{mm}^3</math>;</li> <li>Hyperproliferation of megakaryocytes (some of them</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Presence of clonal marker or absence of evidence of reactive thrombocytosis [10].</li> </ul>

<p>1.03–2.5/100,000 and diagnosis usually occurs in the 6<sup>th</sup> decade of life [15,16].</p> <p>Together with PV, it presents high risks of hemorrhagic and thrombotic episodes [3,12,17–18].</p>	<p>hyperlobulated, and observed in bone marrow biopsy);</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mild increase in granulopoiesis and erythropoiesis;</li> <li>• Absence of criteria for PV, CML and PMF;</li> <li>• Presence of mutations in the <i>JAK2</i> gene (<i>JAK2V617F</i>), <i>CARL</i>, <i>MPL</i>.</li> </ul>
<p>Indolent clinical course and has worse prognosis. Patients show increased megakaryopoiesis and extramedullary hematopoiesis [2–3,19–20]</p> <p>PMF</p> <p>It has an annual global incidence of 1.5–2.0/100,000, and generally affects individuals over 60 to 70 years of age.</p>	<p>Pre-fibrotic phase:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exacerbated proliferation of the megakaryocytic and granulocytic lineage, absence of reticulin fibrosis &gt;1, decreased erythropoiesis and medullary hypercellularity for the patient's age;</li> <li>• Absence of criteria for CML, PV and ET;</li> <li>• Presence of mutations in the <i>CALR</i> gene, <i>JAK2</i> (<i>JAK2V617F</i>) or <i>MPL</i> or other clonal marker.</li> </ul> <p>Pre-fibrotic phase:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia with no known cause;</li> <li>• Leukocytosis <math>11 \times 10^3/\text{mm}^3</math></li> <li>• Palpable splenomegaly;</li> <li>• Increased lactic dehydrogenase.</li> </ul> <hr/> <p>Fibrotic phase:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Megakaryocytic proliferation and atypia, accompanied by grade 2 or 3 reticulin and/or collagen fibrosis;</li> <li>• Does not meet the criteria for PV, ET, CML, MDS or other myeloid neoplasms;</li> <li>• Presence of mutations in the <i>CALR</i>, <i>JAK2</i> (<i>JAK2V617F</i>) or <i>MPL</i> gene or absence of reactive fibrosis.</li> </ul> <p>Fibrotic phase:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia with no known cause;</li> <li>• Leukocytosis <math>11 \times 10^3/\text{mm}^3</math>;</li> <li>• Palpable splenomegaly;</li> <li>• Increased lactic dehydrogenase</li> <li>• Leukoerythroblastosis.</li> </ul>

MPN: myeloproliferative neoplasms; PV: polycythemia vera; ET: essential thrombocythemia; PMF: primary myelofibrosis; Hb; hemoglobin; Ht: hematocrit; CML: chronic myeloid leukemia; MPL: thrombopoietin receptor gene; CALR: calreticulin gene

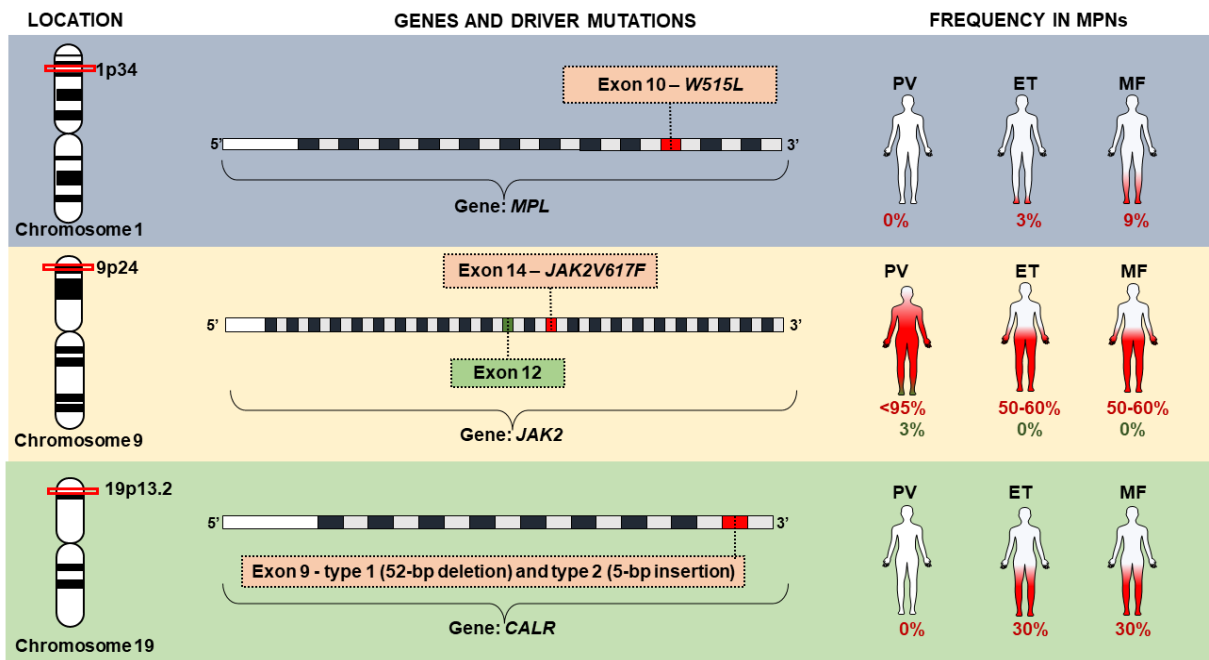
Among the major criteria of BCR/ABL1 negative MPN, the presence of variants in driver genes stands out, as well as the Janus kinase 2 gene (*JAK2*—HGNC: 6192), the thrombopoietin receptor gene (*MPL*—HGNC: 7217) and the calreticulin gene (*CALR*—

HGNC: 1455). Variations in these genes, classified as driver mutations, are determinant in the clinical phenotype observed in MPNs and result in constitutive activation of intracellular signaling pathways [12,19] (Figure 2). Generally, these genomic variations are considered mutually exclusive between BCR/ABL1 negative entities, and their absence does not exclude their diagnosis [10]. However, two variants can be found in the same individual, probably from different neoplastic subclones and those that are often associated with disease progression [19,21].

These driver mutations usually arise again; however, 7% of cases involve familial aggregation, with autosomal dominant inheritance and incomplete penetrance, and a 5 to 7-fold increased risk for first-degree relatives of the patient with the disease, a risk that may involve the same or different myeloproliferative neoplasms [22–24]. Although *JAK2V617F* is linked to autosomal dominant inheritance, most cases of familial inheritance are not associated with *JAK2* gene variants [25]. Nonetheless, mutations in the *EPOR*, *VHL*, *EPAS1*, *HIF* and *EGLN* gene have been found in cases of congenital familial polycythemia [26].

Thus, some determining factors associated with driver mutations should be considered, such as mutations (somatic or germline) that are less specific for MPNs, gender, frequency of the allelic variant and order of acquisition of mutations [27]. In ET and PMF, 12% of patients do not have any of the driver mutations and are called triple-negative. However, whole-exome sequencing analyses have identified mutations in the *JAK2* and *MPL* genes that have a high rate of leukemic transformation in these patients [28].

Among the driver mutations, the *JAK2V617F* variant is the most frequent in triggering PV, ET and PMF [10], which are considered to be a major criterion in polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis [5,29–31]. The *JAK2V617F* variant presents a frequency that is greater than 95% in individuals with PV, and frequency is from 55% to 65% in individuals with ET and PMF, respectively [32]. The presence of *JAK2V617F* causes aberrant signaling of the JAK/STAT pathway, which is an intracellular pathway that is involved in several biological processes, such as hematopoiesis, immune response and activation of other intracellular signaling pathways. Thus, the understanding of *JAK2V617F* signaling mechanisms and the main cells involved in immunothrombosis may provide a basis for the development of immunotherapeutic strategies in myeloproliferative disorders.



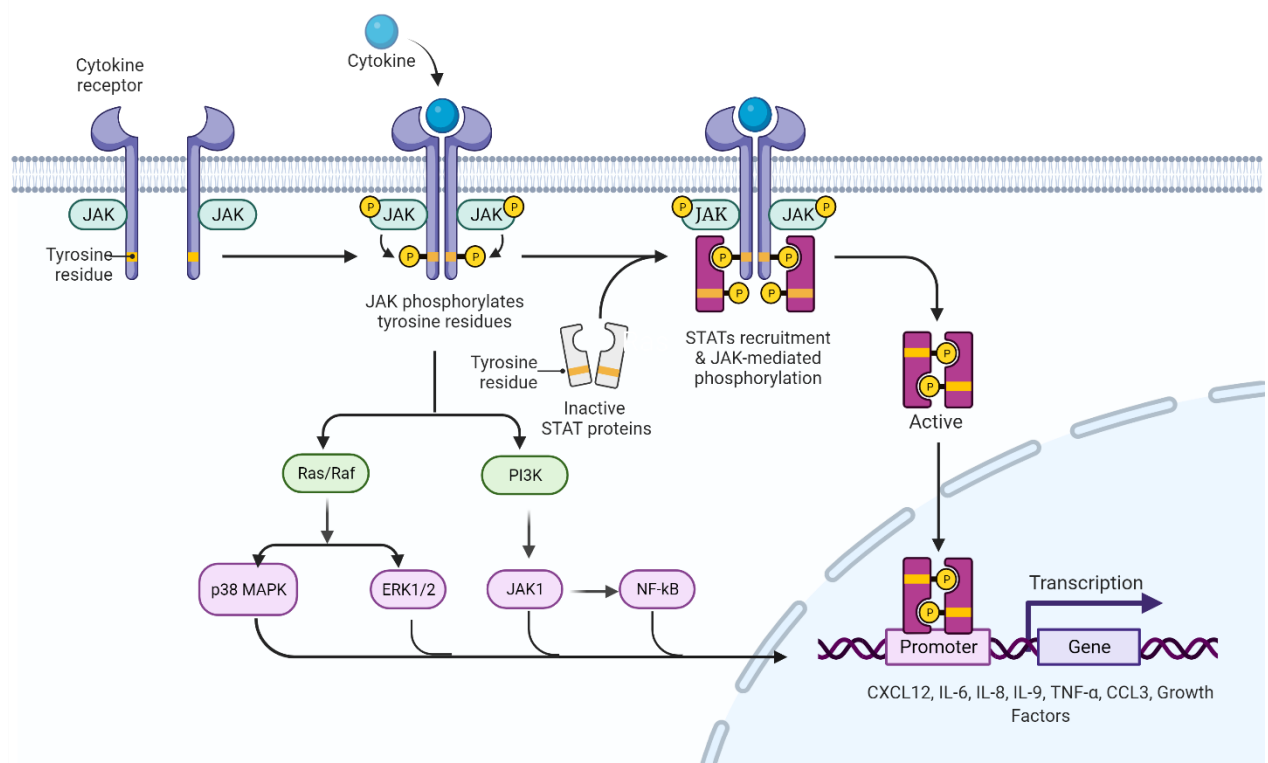
**Figure 2.** Driver mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR* genes associated with chronic myeloproliferative neoplasms (MPN).

The constitutive signaling of *JAK2V617F* is linked to high expression of molecules that are related to the inflammatory response, immune dysregulation and manifestation of inflammatory states [33–35], which is a finding that currently constitutes research targets. Cytokines related to natural immunity are the most expressed in chronic myeloproliferative neoplasms, and are detected even in the medullary stroma [34]. This suggests that inflammation is related to bone marrow stromal initiation, which promotes medullary fibrosis and clonal expansion [35]. In peripheral blood, the interaction between *JAK2V617F* positive hematopoietic cells, endothelium and immunological molecules enhances the immunothrombosis mechanism, thus constituting an independent and unfavorable prognostic factor in the survival of patients with MPNs [36].

As such, the understanding of the *JAK2V617F* signaling mechanisms and the main cells involved in immunothrombosis may provide a basis for the development of immunotherapeutic strategies in myeloproliferative disorders. Therefore, in this review, we describe the *JAK2V617F* variant and its implications for genomic instability and immune dysregulation, as well as its relationship to the onset of chronic inflammation through cellular mechanisms.

## 2. *JAK2V617F*: Genetic Implication in Signaling Pathways

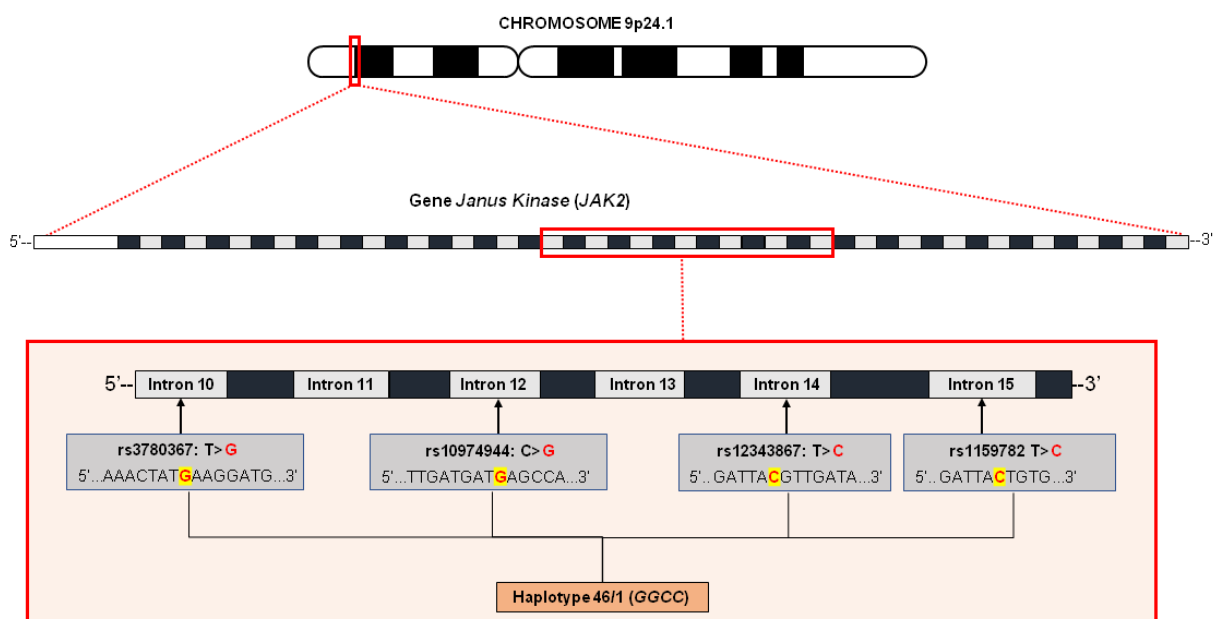
In 2005, the molecular basis of chronic myeloproliferative diseases was described, with the *JAK2V617F* variant (dbSNP ID: rs77375493) characterized by a transversion-type base substitution at nucleotide 1849 (1849G>T) of exon 14 of the *JAK2* gene encoding a valine through a phenylalanine at position 617 (V617F) [37–39]. Metabolically, this genetic alteration leads to a gain-of-function mutation in *JAK2*, a cytoplasmic tyrosine kinase with a central role in the signal transduction of hematopoietic growth factor receptors [40,41]. This change occurs in the pseudokinase domain of *JAK2*, interrupting the auto-inhibitory effect, and resulting in constitutive phosphorylation, which generates hyper phosphorylation, deregulates cellular signals downstream of the *JAK2/STAT5* signaling pathway (Figure 3), interferes with the correct signaling of erythropoietin (EPO) receptors, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte–monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) and thrombopoietin (TPO), and also increases cell proliferation and resistance to apoptosis [ClinVar ID: NM\_004972.3(*JAK2*): c.1849G>T (p. V617F)] [3,41–42].



**Figure 3.** JAK/STAT signaling pathways. In the absence of cytokines, the JAK protein remains inactive in regions close to the intracellular domains of the receptor. When a cytokine binds to a receptor, *JAK* proteins and intracellular domains of the receptor are phosphorylated, activating and recruiting STAT proteins, which dimerize and translocate to the nucleus to initiate the transcription process of genes involved in cell

proliferation. In addition to the activation of the JAK/STAT pathway, there is an interconnection with other intracellular signaling pathways, among the most prominent are the Ras/Raf/MAPK pathway and the PI3K pathway; the latter manifesting interconnection with JAK1 proteins, which indirectly activate the NFkB pathway, the transcriptional factors that activate the production of cytokines (among them CXCL12, IL-6, IL-8, IL-9, TNF- $\alpha$  and CCL3) and the growth factors identified in the inflammatory profile of individuals with chronic myeloproliferative neoplasms. *JAK*: Janus kinase protein; *STAT*: signal transducers and activators of transcription; *MAPK*: mitogen-activated protein kinase; *PI3K*: phosphoinositol kinase 3; *JAK1*: Janus kinase class 1 protein; *NFkB*: light chain nuclear factor B-cell kappa; *CXCL12*: chemokine 12 with CXC motif; *IL-6*: interleukin 6; *IL-8*: interleukin 8; *IL-9*: interleukin 9; *TNF- $\alpha$* : tumor necrosis factor alpha; *CCL3*: chemokine ligand 3.

Analysis of germline cells, such as buccal cells, T cells or both, in cases of familial clustering of myeloproliferative disorders, show absence of the variant allele. In this scenario, the *JAK2V617F* variant is not the first event that leads to disease [22,40,43]. The 46/1 haplotype is a 280 Kb long region of chromosome 9p that includes three genes, including *JAK2*. The part called “GGCC” corresponds to the four main polymorphisms of this haplotype (rs3780367, rs10974944, rs12343867 and rs1159782) that start in intron 10 and end in intron 15 of the *JAK2* gene [44,45] (Figure 4). These four variants are in complete linkage disequilibrium, and are inherited together [44,46]. This haplotype is described as one of those responsible for the processes that precede the acquisition of *JAK2V617F*, increasing the mutation rate of the *JAK2* locus and the probability of acquiring mutations with selective advantage, which is the case of *JAK2V617F* and which, in turn, causes clonal myeloproliferative disorders [31,45–48].



**Figura 4.** Characterization of the 46/1 haplotype without *JAK2* gene. The haplotype, also called GGCC, is altered by four variants located in intron 10 (rs3780367: T> G), intron 12 (rs10974944: C> G), intron 14 (rs12343867: T> C) and intron 15 (rs1159782: T> C). It is believed that the presence of this haplotype conditions an increase in the mutation rate of the gene locus in question, thus resulting in the emergence of mutations with a selective advantage, as in the case of *JAK2V617F*.

It is still unclear how the same mutation is associated with three different disease phenotypes. Possible explanations include inter-individual differences in genetic background, acquisition of additional genetic alterations or in the target cell for transformation [43]. Thus, *JAK2V617F* may even compromise the functionality of cell lines that integrate the hematopoietic and inflammatory processes.

### **3. Implications of the *JAK2V617F* Variant in Positive Cells and Immunothrombosis**

Recent studies have described the relationship between the mechanisms and immune responses expressed by cells involved in the innate and adaptive immune system (neutrophils, monocytes, macrophages, lymphocytes, endothelial cells and platelets) with important molecules of hemostasis, which is a phenomenon currently called immunothrombosis. The immunothrombosis process is multifactorial, generally mediated by hypercellularity, and causes changes in plasma proteins that are important in the process of hemostasis and activation of endothelial molecules, adhesion product and cell function [49–51]. Hypercellularity in peripheral blood is a result of the constitutive activation of the *JAK2/STAT5* pathway, which increases blood viscosity through cell–cell–endothelial interaction, and even forms plasma complexes [49–53]. Thus, the characteristic leukocytosis, erythrocytosis and thrombocytosis in patients with MPNs not only reflect quantitative alterations in hematopoiesis, but also qualitative alterations in the immune response and hemostasis, through the expression of molecules that favor the activated prothrombotic phenotype [50]. It has been well described in the literature that vascular complications of arterial or venous type affect up to one third of individuals with MPNs and constitute one of the main causes of mortality in these individuals [51–52,54–56], especially in ET [53].

*JAK/STAT* pathway activation is involved in the inflammatory response by directly interconnecting with other intracellular signaling pathways involved in cytokine production. Di Rosa et al. [57] demonstrated that CD34+ cells from individuals with PMF showed dysregulated activation of the *JAK2/STAT1* pathway and significant activation

of genes involved in the IFN- $\gamma$  pathway (IFN- $\gamma$ , IRF1 and IFNGR2) compared to healthy individuals, and noted that IFN I and II have been described as mediators of antitumor immunity through activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway, which, in turn, activates the NF $\kappa$ B pathway and promotes antigen presentation and cytokine secretion [56].

On the other hand, the action of programmed death protein (PD-1), mediated by IFN- $\gamma$  expression, which is vital in the tumor recognition process, is dysregulated in patients with MPNs, indicating that *JAK2V617F* positive hematopoietic cells from individuals with MPNs express the PD-L1 ligand, which is a mechanism that blocks the action of Th lymphocytes and contributes to the immune escape of neoplastic cells [58,59]. At the same time, this results in JAK2/STAT3 signaling up to three times greater than normal, which is a fact that is linked to tumor progression associated with inflammation [55]. The experimental murine assay carried out by Prestipino et al. [60] demonstrated oncogenic activity of JAK2 with consequent phosphorylation of STAT3 and STAT5 that facilitates the promotion of PD-L1 activity in *JAK2V617F* positive cells and affects the cell progression cycle of T cells, which is a finding associated with more advanced states of MPNs.

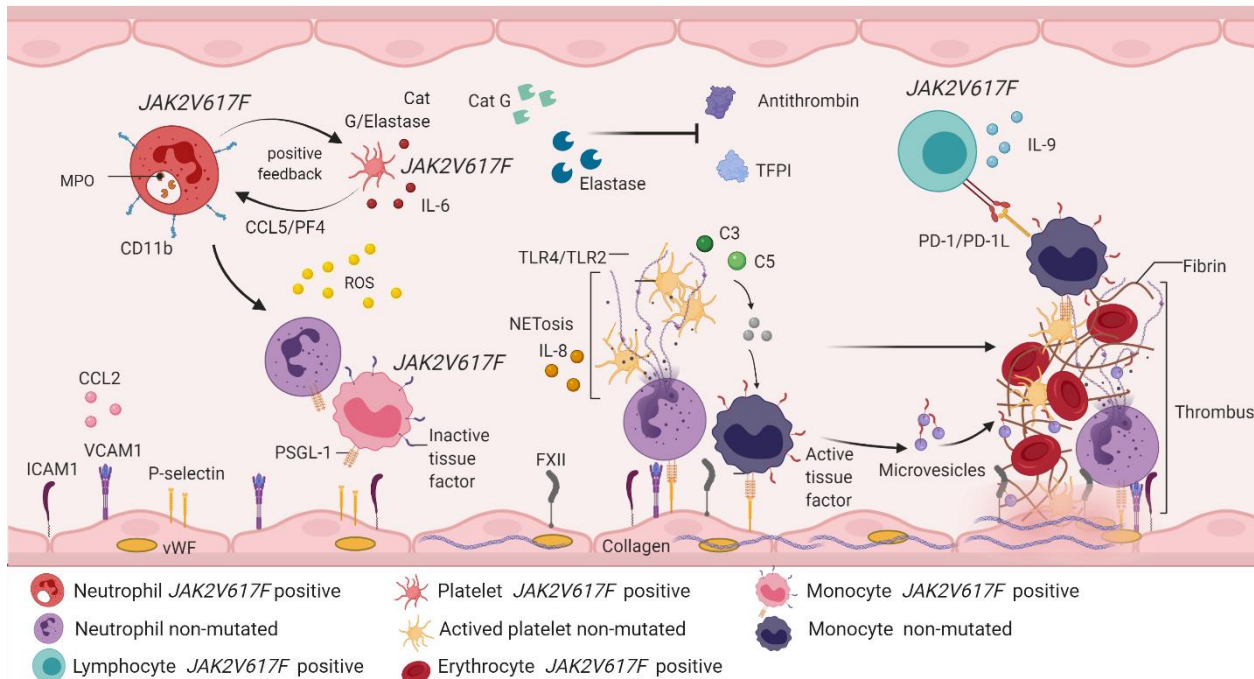
In PMF, there is an altered regulation of T cells, which is determined by the significant activation of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, and this finding is linked to the activation of HLA class I molecules, chronic inflammation and immune dysregulation, thus favoring the activation of fibroblasts and contributing to the progression of medullary fibrosis and cytopenias [54]. Interestingly, the constitutive activation of *JAK2V617F* not only produces alterations in the cellular immune response through classical pathways, it also favors the indirect activation of hypoxia inducible factors (HIF) and erythropoietin (EPO) secretion through the NF $\kappa$ B pathway, generating an hypoxic state of variable severity that favors tissue atrophy and production of erythroid progenitors, an event that contributes to the production of pro-inflammatory cytokines in peripheral blood [58].

Therefore, *JAK2V617F* complexly deregulates intercellular signaling through activation of cytokine production and interruption of homeostasis and cytotoxicity of immune cells [48]. Immune dysregulation in individuals with MPNs is confirmed by high concentrations of IL-6, IL-8, GM-CSF, HGF, VEGF, b-FGF and TGF- $\beta$  in medullary stromal cells and increased production of IL-6, IL-8, IL-9, CCL3, CCL4 and TNF- $\alpha$  in peripheral blood cells [59].

The inflammatory picture is related to the excess of cytokines (generally type I IFN and belonging to the IL-6 family), a product of the constitutive signaling of the



JAK2/STAT5/STAT3 pathway, which directly activates other intracellular signaling pathways committed to the production of pro-inflammatory cytokines [28]. PI3K, MAPK, NF $\kappa$ B and HIF1- $\alpha$  pathways induce tumorigenesis [31] and expression of mediator mechanisms of inflammation in neutrophils, monocytes, macrophages, lymphocytes and platelets [60] (Figure 5).



**Figure 5.** Immunothrombosis involves the participation of hematopoietic cells and immune system cells. *JAK2V617F* positive neutrophils express CD11b on the cell surface and secrete enzymes such as MPO, cathepsin G and elastase. The release of cathepsin G and elastase activates CCL5/PF4 signaling in *JAK2V617F* positive platelets, which is an interaction that creates positive feedback between platelets and neutrophils, and favors the production of IL-6 and ROS. Free cathepsin and elastase inhibit the function of antithrombin and plasma TFPI, contributing to the thrombotic phenotype. Unmutated neutrophils are activated by the action of ROS, which recruit and activate monocytes with PSGL-1 expression and inactive tissue factor. Both cells manifest rolling and endothelial adhesion by binding adhesion molecules expressed in endothelial cells (ICAM1, VCAM1, P-selectin, CCL2 and FXII). Simultaneously, endothelial cells are activated by the action of ROS, releasing vWF and collagen, thus forming a platelet–monocyte–neutrophil interaction, which favors the discharge of genetic and protein material from the neutrophil, starting with NETosis. This brings with it the expression of IL-8 and activation of TLR4/TLR2 in platelets, a fact that allows the expression of receptor glycoproteins and, therefore, platelet aggregation. In NETosis, erythrocytes are recruited and release hemoglobin and increase ROS production. The complement system is active in response to activation of immune cells, especially through the action of C3 and C5, which induces signaling from *JAK2V617F* positive monocytes and non-mutated monocytes. *JAK2V617F* positive monocytes express PD-1L, which immediately activates PD-1 in *JAK2V617F* lymphocytes, a mechanism responsible for the evasion of the immune response described in chronic myeloproliferative neoplasms.

Recruitment and activation of immune and hematopoietic cells benefits the conversion of fibrinogen into fibrin, giving rise to thrombus formation, the main factor involved in vascular complications described in myeloproliferative neoplasms. MPO: myeloperoxidase; CCL5: chemokine ligand 5; PF4: platelet factor 4; IL-6: interleukin 6; ROS: reactive oxygen species; TFPI: plasma tissue factor inhibitor; PSGL-1: P-selectin ligand 1; ICAM-1: intercellular adhesion molecules 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; CCL2: chemokine ligand 2; FXII: factor XII; vWF: Von Willebrand factor; IL-8: interleukin 8; TLR2/TLR4: Toll-like receptor 2/4; C3: complement component 3; C5: complement component 5; PD-1: programmed death protein; PD-L1: programmed death protein ligand 1.

### *3.1. Neutrophils*

Neutrophils constitute a large percentage of leukocytes in peripheral blood and are involved in immune response processes against antigens. Neutrophils from individuals with MPNs have abundant basal amounts of reactive oxygen species (ROS), especially in patients with PMF, which are induced by JAK2-dependent ERK signaling and constitutive phosphorylation, producing NADPH oxidase and neutrophil activation by myeloperoxidase expression [61].

The activation and recruitment of leukocytes contributes to the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), which are networks made up of genetic material and protein derived from neutrophils, and which favor cell activation, production of reactive oxygen species, platelet activation and aggregation and endothelial damage [62]. Activated neutrophils express CD11b on the cell surface and secrete elastase and myeloperoxidase, which favors the chemotaxis of neutrophils, monocytes and macrophages and facilitates endothelial adhesion [63–66]. Simultaneously, the expression of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 integrins in recruited neutrophils is favored, and glycoproteins are expressed by interconnection of the JAK/STAT pathway with Rap1-GT-Pasa, which have affinity for vascular cell adhesion molecules (VCAM-1) and for intercellular adhesion molecules (ICAM-1) expressed by endothelial cells [67–70], thus enhancing endothelial adhesion. Likewise, expression of P-selectin ligand 1 (PSGL-1) and cell adhesion molecule type 1 (MAC-1) in neutrophils contributes to the release of cathepsin G (a neutrophilic degradative enzyme important in the elimination of pathogens and in the degradation of components in inflammatory sites), which, together with elastase, determines a positive feedback through the expression of CCL5 and platelet factor 4 (PF4) in platelets, stimulating the expression of P-selectin and GPIIb in platelets and favoring the thrombogenesis process [52].

An interesting finding is that both elastase and cathepsin G block the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and antithrombin (AT), which are two potent natural anticoagulants, and this contributes to the activation of the proteinase 4 receptor (PAR4) pathway in platelets, Von Willebrand factor exposure and initiation of the coagulation cascade [51,71].

Thus, neutrophil activation allows the release of DNA-histone complexes (especially H3 and H4) that induce the production of NETs and platelet activation via NF- $\kappa$ B and TLR2 and TLR4 function [67], with a consequent expression of GPaIIb3 contributing to platelet aggregation and formation of thrombin in the extrinsic pathway [68]. Histone-MPO complexes have also been found in the plasma of individuals with MPNs and to be associated with high levels of LDH [61]. As such, NETosis plays a crucial role in tumor expansion in MPNs by enhancing immunothrombosis and activating hemostasis, thus forming a repetitive cycle [66].

Since we now know about the active participation of neutrophils in the process of immunothrombosis in MPNs, there has been great interest in identifying neutrophil subtypes involved in this mechanism. Tumor-associated neutrophils (TANs), also classified as PMN-MDSCs, can be subdivided into N1 (neutrophils with anti-tumor action) and N2 (neutrophils with pro-tumor action) [68,72–73], both in human and murine models, and are found in circulation and in the microenvironment of patients with tumorigenic and inflammatory conditions [70]. TANs directly contribute to the angiogenesis process through significant release of ROS and consequent formation of NETs through expression of CD11b and elastase [71].

The presence of TANs is also documented in processes of infiltration, invasion and metastasis of solid tumors, such as melanoma, advanced gastric carcinoma, infantile brain tumor [72] and even in cases of acute pancreatitis [74–77]. In these types of tumors, TANs are sensitive to microenvironmental signals caused by the secretion of CXCL1, CXCL2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-8 [70], which favors local invasion, functional overexpression of neutrophils and functional suppression of T lymphocytes. However, the role of TANs in hematologic malignancies has been sparsely described. In 2019, the study by Podaza and Risnik [78] aimed to detect TANs in individuals with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and found that the proportion of TANs in patients with CLL was greater, with high concentrations of IL-8, an important molecule in the induction of NETs. Unfortunately, due to the scarce description of surface markers in this classification of neutrophils, the research does not discriminate the TAN (N1/N2)

phenotypes found, which are defined by the production capacity of ROS and NETs. Nonetheless, some recent studies have aimed to describe the phenotyping of these neutrophil subpopulations to better characterize them, especially their role in hematological diseases.

### 3.2. Platelets

Platelet activation and dysfunctionality is a well-described phenomenon in thrombotic and hemorrhagic processes in patients with MPNs, and it is worth mentioning that some platelet markers, such as P-selectin, CD41L,  $\beta$ -thromboglobulin, PF4 and platelet-derived growth factor (PDGF), have been detected in high concentrations in the plasma of individuals with ET and PV [52,54], which are biomarkers associated with thrombotic complications. The expression of these markers induces a hemostatic response through exposure and activation of tissue factor (a product of endothelial damage), directly activating the extrinsic pathway of the coagulation cascade and consequent fibrin production. In this process, activated platelets expose negatively charged phospholipids that confer proteolytic reaction of coagulation factors, acting as mediators between coagulation and inflammation through activation of the complement cascade, especially of C3 and C5 molecules [66].

Interestingly, patients with MPNs can also manifest high basal levels of phosphatidylserine in the platelet membrane, which in turn develops a pro-coagulant function, and which is a finding that demonstrates that platelets are the central target in the development of vascular and inflammatory complications in MPNs [75]. Thus, the presence of the *JAK2V617F* mutation could potentiate platelet activation and contribute to persistent thrombosis in these patients.

On the other hand, the constant circulation of complexes and activation of platelet proteins can expose molecules derived from endothelial cells, favoring endothelial activation and damage through TLR-4 signaling in platelets [76]. As such, endothelial activation is promoted by high levels of reactive oxygen species, which are released by neoplastic platelet–neutrophil complexes that lead to exposure of Von Willebrand factor, collagen, platelet–endothelial cell adhesion molecules (PECAM), E-selectins and thrombomodulin, as well as CD40L (an important tissue factor inducer), which are all molecules that favor endothelial adhesion and are directly involved in the activated thrombotic picture [75,79]. In the active process of hemostasis, the expression of some biomarkers, such as thrombin, D-D, FVIII, fibrinogen, CD40L and platelet integrins, is

detected; that, together with tissue factor, protein S, protein C, Von Willebrand factor and P-selectins, favors the perpetuation of active hemostasis, cell adhesion and recruitment of leukocytes and erythrocytes [76]. Although platelets form complexes with neutrophils, platelet–monocyte aggregates have also been found, especially in patients with ET [77].

The interaction between platelets and endothelial cells most likely contributes to the production of soluble selectins and the reduction of nitric oxide (a consequence of high levels of reactive oxygen species and MPO), which benefits the laminar vessel reduction and vascular obstruction [51,80]. Poisson et al. [81] provide confirmation of this, in which endothelial cells showed a dysfunction of the nitric oxide pathway, the cause of the accumulation of microvesicles derived from MPO-carrying erythrocytes, which increased endothelial oxidative stress and compromised the vascular response to vasoconstrictors. This implies a possible participation of erythrocytes in this process. Therefore, in hematopoietic cells, oxidative stress and chronic inflammation status is favored by the vicious cycle of biomacromolecule production that contributes to genomic instability, mutation acquisition, tissue damage and acute leukemia transformation [82,83].

On the other hand, hemorrhagic conditions can also be presented in patients with MPNs, and are linked to increased platelet consumption (product of thrombogenesis) due to the absence of a connection with high molecular weight multimers of the Von Willebrand factor and dysfunctionality of platelet-dense granules [84]. However, hemorrhagic complications are more often described in individuals with PMF and PV, compared to those with ET [85]. An important finding about this is that individuals with mutated *ASXL1*-PMF have a poor prognosis and a high risk of complications in hemostasis [86]. Unfortunately, a relationship between mutations in *ASXL1* and the development of bleeding disorders in patients with PMF has not yet been established.

Matsuura et al. [87] observed a significant reduction of platelet-dense granules in *JAK2V617F* positive platelets, suggesting that hyperactivation in *JAK2* affects the development of an ensemble of these granules in platelets in the thrombopoiesis process. As a result, the role that *JAK2* signaling plays in the control of dense granules in platelets has never been reported.

### 3.3. Monocytes

Monocytes play an important role in the process of immunothrombosis, which is also an independent and unfavorable prognostic factor in the survival of patients with PV

and PMF, since they are mediators of inflammation, thrombosis and medullary fibrosis due to the secretion of high concentrations of cytokines and the presentation of an unbalanced response to IL-10. In the bone marrow, the pro-inflammatory cytokine signaling promotes the interaction between malignant clone and stromal cells, which stimulates osteoclastogenesis in the endosteal niche and causes the emergence of fibrocyte clones involved in the induction of medullary fibrosis in PMF [36]. This mechanism is promoted through cell cycle dysregulation in fibroblasts, and accelerates the mal-differentiation process so that it loses the ability to repair hematopoietic tissue (may be a product of the oxidative stress) and contributes to marrow fibrosis [88].

By using single-cell RNA-seq, Leimkuhler et al. [89] demonstrated that transcriptomics of mesenchymal stromal cells of primary myelofibrosis patients show loss of hematopoietic niche support, decreased multipotent progenitor status cell, upregulated JAK/STAT and TGF- $\beta$  signaling and upregulation of extracellular matrix proteins like collagen.

Indirectly, monocyte activation is determined by exposure to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs), thus providing exposure to tissue factor and CD25 and benefiting activation of proteins with procoagulant action and NF $\kappa$ B signaling [90].

On the other hand, monocyte activation may be favored by the expression and binding of PSGL-1 to platelet P-selectin, favoring the expression of inflammatory cytokines [71]. Therefore, platelet–monocyte interaction induces a pro-inflammatory phenotype through the expression of CD147, PSGL-1, EP1/EP2 and COX-2 as well as the activation of integrins that contribute to endothelial adhesion and monocyte recruitment [91]. Confirmation of this is found in the study by Wei Wang et al. [52], in which *JAK2V617F* positive macrophages manifested a high expression of inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ), nitric oxide synthase (iNOS), ligand-2 chemokine (CCL2) and activation of the *MAPK* pathway, and they noted that monocytes showed remarkably distinct rolling and cell adhesion when compared to wild-type cells.

It is important to mention that macrophages are subdivided into type M1 and type M2, that both cell subtypes are activated by the NF $\kappa$ B signaling pathway, and that they have cellular functions similar to N1 and N2, respectively [92]. M2 is the largest component in neoplastic tissues, and directly contributes to the tumor environment, proliferation, angiogenesis and release of cytokines that lead to neoplastic expansion [93]. However, M2 has been sub-classified into M2a, M2b and M2c; though it is worth noting

that monocyte/macrophage accumulation of M2b can promote growth, invasion and recurrence of cancers in vitro and in vivo [93].

In the study by Molitor et al. [94], it was observed that *JAK2V617F* positive M2 in patients with PMF showed greater capacity for colony formation through the secretion of pro-fibrotic molecules, such as CCL2, IL-8, matrix metalloproteinase-9 (MMP9), galectin 3 (LGALS3) and osteopontin (SPP1), which drive the proliferation and production of collagen. Nonetheless, further research is needed regarding the role of macrophage subclasses in different MPN phenotypes.

### 3.4. *T Helper and Natural Killer Lymphocytes*

Although lymphocytes are not well described in MPNs, these cells may also be involved in immune dysregulation. T lymphocytes have a long lifespan and this possibly contributes to greater signaling of disruptive effects in the immune system [95]. In some PMF cases, T lymphocytes carry 3–83% of variant allele frequency of *JAK2V617F*, accompanied by abnormalities in the karyotype, such as 13q-, 20q-, monosomy 7 and inv(3). It is noted that these last two chromosomal alterations confer an unfavorable prognosis [95–98]. Just as in lymphocytes, the role of natural killer (NK) cells in MPNs has not been widely described.

NK cells are associated with the control of tumor growth and metastasis, which indicates that NK cell deficiency is very rare and is generally linked to lymphoproliferative disorders [98]. However, the study by Arantes [99] demonstrated that NK cell *JAK2V617F*-positive patients had lower NKCD16+ CD56<sup>dim</sup> counts compared to NK cell *JAK2V617F*-negative patients, especially those with PV and PMF, which is a finding that suggests that NK cells may be defective in MPNs. Although there have been some investigations into the role of lymphocytes and NK cells in these hematological diseases, further research is needed in order to elucidate their role in the evolution of these diseases and in the development of immunothrombosis in MPNs.

## 4. Summary and Perspectives

The clinical approach to patients with myeloproliferative neoplasms is based on the control of vascular complications, both arterial and venous, since these are events that result in the main cause of morbidity and mortality due to hematological diseases. According to recent investigations, thrombohemorrhagic complications are attributed to the presence and high allelic frequency of *JAK2V617F* [100], suggesting that the presence

of the *JAK2* 46/1 haplotype has not been related to the production of inflammatory biomarkers that can be expressed in immunothrombosis [101]. Likewise, the link between *JAK2V617F* and dysregulations in the immune response and hemostasis is well-described and associated with the interconnection of the JAK/STAT pathway with other intracellular signaling pathways, such as PI3K/AKT, Ras/Raf/MAPK and NFκB, in the apoptotic process and in the production of inflammatory molecules [59]. In addition, next-generation sequencing investigations have described other genes involved in these signaling pathways (*FLT3*, *GNAS*, *KIT*, *KRAS*, *NF1*, *NRAS*, *PTPN11* and *SH2B3*), in epigenetic regulator genes (*TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A* and *EZH2*) and negative regulator genes of the *JAK2* signaling pathway (*SOCS* and *CBL*), since they showed a strong association with dysregulations in cytokine production and secretion [102,103]. These could be excellent research targets in pathogenic mechanisms of MPN, and be employed as predictors of worse clinical outcome, stratification risk or even as leukemia transformation predictors [104].

The International Working Group—Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG–MRT) established a prognostic algorithm for thrombotic complications in common with *BCR/ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms, especially in PV and ET, based on the variables of age (>60 years), percentage of homozygosity of *JAK2V617F* and history of thrombotic events, which are factors that define the categories of low risk, very low risk, intermediate and high risk of thrombotic and vascular complications [5].

Cytoreductive therapy in individuals with PV, ET and PMF is often scrutinized but widely used to alleviate the clinical picture and reduce the risk of these complications. Thus, the drug of choice in individuals with PV and ET is hydroxyurea (HU). Unfortunately, resistance or intolerance to HU have been described in 15–20% of patients with MPN [105]. This phenomenon is a challenge in the treatment of these patients because it reduces the therapeutic options and increases disease progression or the thrombotic risk [105]. Many investigations regarding this have been carried out and suggest that the existence of other molecular alterations in the kinase domain of *JAK2* protein or in non-driver genes could be the reason for the pharmacological refractory [106,107].

Ruxolitinib, a drug approved a few years ago by the FDA, is also considered an excellent pharmacological choice in patients resistant to HU in PV [108]. However, murine models demonstrated that its pharmacological action does not present anti-



leukemic activity *in vivo* in the bone marrow [109], which is a finding that could suggest a possible contribution from other deregulated cellular signaling, and is a target that would also be interesting in the prognosis of these patients. In PMF, the treatment of choice is HU, and using ruxolitinib for cases refractory to HU and patients classified as high risk [109]. In young high-risk patients with PMF, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is considered. Nevertheless, the use of cytoreductive drugs for reticular fibrosis or collagen would increase the chances of survival in these individuals; it is worth noting that PMF is the *BCR/ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasm with the greatest association with leukemic transformation.

On the other hand, inhibition of platelet function in *BCR/ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms is one of the main functions, since, as previously described, platelets play a central role in the process of immunothrombosis. Thus, the use of antiplatelet agents reduces the rate of occurrence and recurrence of thrombo-hemorrhagic and inflammatory events [80]. Low molecular weight heparin, aspirin and clopidogrel are the main drugs used to control platelet activation. Although they are the most frequently used drugs in these diseases, the use of new drugs that inhibit the expression of platelet receptors, platelet adhesion molecules and cytokines would favor the reduction of thrombus formation and, consequently, the development of immunothrombosis [5]. Likewise, inhibition of the expression of integrins, adhesion molecules and other membrane proteins in neutrophils, monocytes, lymphocytes and endothelial cells constitutes a promising strategy in individuals with *BCR/ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms as treatment targets [66], especially in those with drug resistance and categorized as high risk.

Despite the detection of microvesicles, cellular complexes and other inflammatory markers have been comprehensively discussed in MPN, and detection of mi-RNAs is actually considered a metabolic response marker, before, during and after lymphoma treatment [110]. Moreover, the advance in molecular techniques leads us to the development of noninvasive techniques, such as liquid biopsy, that could be a potential tool, especially in non-solid cancers, for prognosis and monitoring indicators in hematologic malignancies [111]. Currently, analyzing the circulating cell-free (cf)-DNA is proposed as a noninvasive tool for use in the diagnosis and prognosis of hematologic malignancies, which could be employed to differentiate between MPN subtypes, as well as to predict the development of thrombotic complications [111–112].

**Author Contributions:** Conceptualization: D.G.T., J.P, A.M.T. and L.P.d.S.M.; writing—original draft preparation: D.G.T., J.P., A.M.T. and L.P.d.S.M; writing—review and editing: A.M.T., L.P.d.S.M., A.G.d.C., G.V.S. and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) [Pró-Estado Program—#002/2008, #007/2018 and #005/2019; POSGRAD Program—#006/2021, Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable

**Informed Consent Statement:** Not applicable

**Data Availability Statement:** Not applicable

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Tremblay, D.; Yacoub, A.; Hoffman, R. Overview of Myeloproliferative Neoplasms: History, Pathogenesis, Diagnostic Criteria, and Complications. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2021**, *35*, 159–176, doi: 10.1016/j.hoc.2020.12.001.
2. Chauffaille, M. Neoplasias mieloproliferativas: Revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2010**, *32*, 308–316, doi: 10.1590/S1516-84842010005000091.
3. Nangalia, J.; Green, A.R. Myeloproliferative neoplasms: From origins to outcomes. *Hematology*. **2017**, *1*, 470–479, doi: 10.1182/asheducation-2017.1.470.
4. Tefferi, A. The history of myeloproliferative disorders: Before and after Dameshek. *Leukemia*. **2008**, *22*, 3–13, doi: :10.1038/sj.leu.2404946.
5. Tefferi, A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am. J. Hematol.* **2016**, *91*, 50–58, doi: 10.1002/ajh.24221.
6. Means, R.T. JAK2 V617F and the evolving paradigm of polycythemia vera. *Korean, J. Hematol.* **2010**, *45*, 90, doi: 10.5045/kjh.2010.45.2.90.

7. Bortolheiro, T.C.; Chiattonne, C.S. Leucemia mielóide crônica: História natural e classificação. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2008**, *30*, 3–7, doi: 10.1590/S1516-84842008000500003.
8. Rowley, J.D. A story of swapped ends. *Science.* **2013**, *340*, 1412–1413, doi: 10.1126/science.1241318.
9. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M.; Le Beau, M.; Bloomfield, C.; Cazzola, M.; Vardiman, J. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* **2016**, *127*, 2391–2405, doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
10. Barbui, T.; Thiele, J.; Gisslenger, H.; Kvasnicka, H.M.; Vannucchi, A.; Guglielmelli, P.; Orazi, A.; Tefferi, A. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: Document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer, J.* **2018**, *8*, 1–11, doi: 10.1038/s41408-018-0054-y.
11. Ortmann, C.A.; Kent, D.G.; Nangalia, J.; Silber, Y.; Wedge, D.C.; Grinfeld, J.; Baxter, E.J.; Massie, C.E.; Papaemmanuil, E.; Menon, S.; Godfrey, A.L.; Dimitropoulou, D.; Guglielmelli, P.; Bellosillo, B.; Besses, C.; Döhner, K.; Harrison, C.N.; Vassiliou, G.S.; Vannucchi, A.; Campbell, P.J.; Green, A.R. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 601–612, doi: 10.1056/NEJMoa1412098.
12. Campbell, P.J.; Green, A.R. The myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *57*, 428–435, doi: 10.1177/003693306501000606.
13. Grinfeld, J.; Nangalia, J.; Baxter, E.J.; Wedge, D.C.; Angelopoulos, N.; Cantrill, J.; Godfrey, A.L.; Papaemmanuil, E.; Gundem, G.; MacLean, C.; Cook, J.; O’Neil, L.; O’Meara, S.; Teague, J.W.; Butler, A.P.; Massie, C.E.; Williams, N.; Nice, F.L.; Andersen, C.L.; Hasselbalch, H.C.; Guglielmelli, P.; Mullin, M.F.; Vannucchi, A.M.; Harrison, C.N.; Gerstung, M.; Green, A.R.; Campbell, P.J. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1416–1430, doi: 10.1056/NEJMoa1716614.
14. Szuber, N.; Vallapureddy, R.; Penna, D.; Lasho, T.L.; Finke, C.; Hanson, C.A.; Ketterling, R.P.; Pardanni, A.; Gangat, N.; Tefferi, A. Myeloproliferative neoplasms in the young: Mayo Clinic experience with 361 patients age 40 years or younger. *Am. J. Hematol.* **2018**, *93*, 1474–1484, doi: 10.1002/ajh.25270.
15. Harrison, C.N.; Koschmieder, S.; Foltz, L.; Guglielmelli, P.; Flindt, T.; Koehler, M.; Mathias, J.; Komatsu, N.; Boothroyd, R.N.; Spierer, A.; Perez, J.; Taylor-Stokes, G.;

- Waller, J.; Mesa, R.A. The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: Results from the international MPN Landmark survey. *Ann. Hematol.* **2017**, *96*, 1653–1665, doi: 10.1007/s00277-017-3082-y.
16. Tefferi, A.; Pardanani, A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncol.* **2015**, *1*, 97–105, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.89.
  17. Meyer, S.; Levine, R.S. Molecular Pathways: Molecular Basis for Sensitivity and Resistance to JAK Kinase Inhibitors. *Clin Cancer Res.* **2014**, *15*, 2051–2059, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0279.
  18. Lundberg, P.; Karow, A.; Nienhold, R.; Looser, R.; Hao-Shen, H.; Nissen, I.; Girsberger, S.; Lehmann, T.; Passweg, J.; Stern, M.; Beisel, C.; Kralovics, R.; Skoda, R.C. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **2014**, *123*, 2220–2228, doi: 10.1182/blood-2013-11-537167.
  19. Papaemmanuil, E.; Gerstung, M.; Malcovati, L.; Tauro, S.; Gundem, G.; Van Loo, P.; Yoon, C.J.; Ellis, P.; Wedge, D.C.; Pellagatti, A.; Shlien, A.; Groves, M.J.; Forbes, S.A.; Raine, K.; Hinton, J.; Mudie, L.J.; McLaren, S.; Hardy, C.; Latimer, C.; Della Porta, M.G.; O’Meara, S.; Ambaglio, I.; Galli, A.; Butler, A.P.; Walldin, G.; Teague, J.W.; Quek, L.; Sternberg, A.; Gambacorti-Passerini, C.; Cross, N.C.P.; Green, A.R.; Boulwood, J.; Vyas, P.; Hellstrom-Lindberg, E.; Bowen, D.; Cazzola, M.; Stratton, M.R.; Campbell, P.J. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **2013**, *122*, 3616–3627, doi: 10.1182/blood-2013-08-518886.
  20. Guglielmelli, P.; Lasho, T.L.; Rotunno, G.; Score, J.; Mannarelli, C.; Pancrazzi, A.; Biamonte, F.; Pardanani, A.; Zoi, K.; Reiter, A.; Duncombe, A.; Fanelli, T.; Pietra, D.; Rumi, E.; Finke, C.; Gangat, N.; Ketterling, R.P.; Knudson, R.A.; Hanson, C.A.; Bosi, A.; Pereira, A.; Manfredini, R.; Cervantes, F.; Barosi, G.; Cazzola, M.; Cross, N.C.P.; Vannucchi, A.M.; Tefferi, A. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: An international study of 797 patients. *Leukemia*, **2014**, *28*, 1804–1810, doi: 10.1038/leu.2014.76.
  21. Kralovics, R.; Stockton, D.W.; Prchal, J.T. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. *Blood*. **2003**, *102*, 3793–3796, doi: 10.1182/blood-2003-03-0885.

22. Rumi, E.; Harutyunyan, A.S.; Pietra, D.; Milosevic, J.D.; Casetti, I.C.; Bellini, M.; Them, N.C.C.; Cavalloni, C.; Ferretti, V.V.; Milanesi, C.; Berg, T.; Sant'Antonio, E.; Boveri, E.; Pascutto, C.; Astori, C.; Kralovics, R.; Cazzola, M. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood*. **2014**, *123*, 2416–2419, doi: 10.1182/blood-2014-01-550434.
23. Landgren, O.; Goldin, L.R.; Kristinsson, S.Y.; Helgadóttir, E.A.; Samuelsson, J.; Björkholm, M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*. **2008**, *112*, 2199–2204, doi: 10.1182/blood-2008-03-143602.
24. Langabeer, S.E.; Haslam, K.; Linders, J.; Percy, M.J.; Conneally, E.; Hayat, A.; Hennessy, B.; Leahy, M.; Murphy, K.; Murray, M.; Ni Ainle, F.; Thornton, P.; Sargent, J. Molecular heterogeneity of familial myeloproliferative neoplasms revealed by analysis of the commonly acquired JAK2, CALR and MPL mutations. *Fam. Cancer*. **2014**, *13*, 659–663, doi: 10.1007/s10689-014-9743-2.
25. Higgs, J.R.; Sadek, I.; Neumann, P.E.; Ing, V.W.; Renault, N.K.; Berman, J.N.; Greer, W.L. Familial essential thrombocythemia with spontaneous megakaryocyte colony formation and acquired JAK2 mutations. *Leukemia*. **2008**, *22*, 1551–1556, doi: 10.1038/leu.2008.115.
26. Aljabry, M. Primary familial and congenital polycythemia; The forgotten entity. *J. Appl. Hematol.* **2018**, *9*, 39–43, doi: 10.4103/joah.joah\_30\_18.
27. Mounier, N. Malignant hematology. *Oncologie*. **2008**, *10*, 512–514, doi: 10.1007/s10269-008-0922-3.
28. Milosevic, J.D.; Nivarthi, H.; Gisslinger, H.; Leroy, E.; Rumi, E.; Chachoua, I.; Bagienski, K.; Kubsova, B.; Pietra, D.; Gisslinger, B.; Milanesi, C.; Jäger, R.; Chen, D.; Berg, T.; Schalling, M.; Schuster, M.; Bock, C.; Constantinescu, S.N.; Cazzola, M.; Kralovics, R. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. **2016**, *127*, 325–332, doi: 10.1182/blood-2015-07-661835.
29. de Freitas, R.M.; da Costa Maranduba, C.M. Myeloproliferative neoplasms and the JAK/STAT signaling pathway: An overview. *Rev. Bras. Hematol. Hemot.* **2015**, *37*, 348–353, doi: 10.1016/j.bjhh.2014.10.001.

30. Tefferi, A.; Barbui, T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis , risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* **2019**, *2*, 133–143, doi: 10.1002/ajh.25303.
31. Vainchenker, W.; Kralovics, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* **2017**, *129*, 667–679, doi: 10.1182/blood-2016-10-695940.subtypes.
32. Bousoik, E.; Aliabadi, H.M. Do We Know Jack2 About JAK ? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 1–20, doi: 10.3389/fonc.2018.00287.
33. Milosevic, J.D., Schischlik, F.; Jäger, R.; Ivanov, D.; Eisenwort, G.; Keller, A.; Schuster, M.; Hadzijusufovic, E.; Krauth, M.; Spörk, R.; Gisslinger, B.; Koller, E.; Fillitz, M.; Pfeilstocker, M.; Sliwa, T.; Keil, F.; Bock, C.; Gisslinger, H.; Kralovics, R.; Valent, P. Overexpression of PD-L1 Correlates with JAK2-V617F Mutational Burden and Is Associated with Chromosome 9p Uniparental Disomy in MPN. *Blood.* **2020**, *136*, doi: 10.1182/blood-2020-137447.
34. Koschmieder, S.; Mughal, T.; Hasselbalch, H.C.; Barosi, G.; Valent, P.; Kiladjian, J.; Jeryczynski, G.; Gisslinger, H.; Jutzi, J.S.; Pahl, H.L.; Hehlmann, R.; Vannucchi, A.M.; Cervantes, F.; Silver, R.T.; Barbui, T. Myeloproliferative neoplasms and inflammation: Whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both. *Leukemia.* **2016**, *30*, 1018–1024, doi: 10.1038/leu.2016.12.
35. Gleitz, H.; Dugourd, A.J.F.; Leimkuhler, N.B.; Snoeren, I.A.M.; Fuchs, S.N.; Menzel, S.; Ziegler, S.; Kroger, N.; Trivai, I.; Busche, G.; Kreipe, H.; Banjanin, B.; Pritchard, J.E.; Hoogenboezem, R.; Bindels, E.M.; Schumacher, N.; Rose-John, S.; Elf, S.; Saez-Rodriguez, J.; Kramann, R.; Schneider, R.K. Increased CXCL4 expression in hematopoietic cells links inflammation and progression of bone marrow fibrosis in MPN. *Blood.* **2020**, *136*, 2051–2064, doi: 10.1182/blood.2019004095.
36. Verstovsek, S.; Manshouri, T.; Pilling, D.; Bueso-Ramos, C.E.; Newberry, K.J.; Prijic, S.; Knez, L.; Bozinovic, K.; Harris, D.M.; Spaeth, E.L.; Post, S.M.; Multani, A.S.; Rampal, R.K.; Ahn, J.; Levine, R.L.; Creighton, C.J.; Kantarjian, H.M.; Estrov, E. Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 1723–1740, doi: 10.1084/jem.20160283.
37. Baxter, E.J.; Scott, L.M.; Campbell, P.J.; East, C.; Fourouclas, N.; Swanton, S.; Vassiliou, G.S.; Bench, A.J.; Boyd, E.M.; Curtin, N.; Scott, M.A.; Erber, W.N.;

- Green, A.R. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. **2005**, *365*, 1054–1061, doi: 10.1016/S0140-6736(05)74230-6.
38. Levine, R.L.; Wadleigh, M.; Cools, J.; Ebert, B.L.; Wernig, G.; Huntly, B.J.P.; Boggon, T.J.; Wlodarska, I.; Clark, J.J.; Moore, S.; Adelsperger, J.; Koo, S.; Lee, J.C.; Gabriel, S.; Mercher, T.; D'Andrea, A.; Fröhling, S.; Döhner, K.; Marynen, P.; Vandenberghe, P.; Mesa, R.A.; Tefferi, A.; Griffin, J.D.; Eck, M.J.; Sellers, W.R.; Meyerson, M.; Golubb, T.D.; Lee, S.J.; Gilliland, D.G. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. **2005**, *7*, 387–397, doi: 10.1016/j.ccr.2005.03.023.
39. Kralovics, R.; Passamonti, F.; Buser, A.S.; Teo, S.-S.; Tiedt, R.; Passweg, J.R.; Tichelli, A.; Cazzola, M.; Skoda, R.C. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. **2005**, *352*, 1779–1790, doi: 10.1056/NEJMoa051113.
40. James, C.; Ugo, V.; Le Couédic, J.P.; Staerk, J.; Delhommeau, F.; Lacout, C.; Garçon, L.; Raslova, H.; Berger, R.; Bennaceur-Griscelli, A.; Villeval, J.L.; Constantinescu, S.N.; Casadevall, N.; Vainchenker, W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. **2005**, *434*, 1144–1148, doi: 10.1038/nature03546.
41. Abdulqader, A.; Saeed, B.; Getta, H.A.; Khoshnaw, N.; Abdulqader, G.; Mohammed, A. Prevalence of JAK2 V617F, CALR, and MPL W515L Gene Mutations in Patients with Essential Thrombocythemia in Kurdistan Region of Iraq. *Korean, J. Clin. Lab. Sci*. **2021**, *53*, 41–48, doi: 10.15324/kjcls.2021.53.1.41.
42. Staerk, J.; Constantinescu, S.N. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. *JAK-STAT*. **2012**, *1*, 184–190, doi: 10.4161/jkst.22071.
43. Hermouet, S.; Vilaine, M. The JAK2 46/1 haplotype: A marker of inappropriate myelomonocytic response to cytokine stimulation, leading to increased risk of inflammation, myeloid neoplasm, and impaired defense against infection?. *Haematologica*. **2011**, *96*, 1575–1579, doi: 10.3324/haematol.2011.055392.
44. Olcaydu, D.; Rumi, E.; Harutyunyan, A.; Passamonti, F.; Pietra, D.; Pascutto, C.; Berg, T.; Jäger, R.; Hammond, E.; Cazzola, M.; Kralovics, R. The role of the JAK2

- GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. **2011**, *96*, 367–374, doi: 10.3324/haematol.2010.034488.
45. Jones, A.V.; Cross, N.C.P. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther. Adv. Hematol.* **2013**, *4*, 237–253, doi: 10.1177/2040620713489144.
  46. Tashi, T.; Swierczek, S.; Prchal, J.T. Familial MPN Predisposition.. *Curr. Hematol. Malign. Rep.* **2017**, *12*, 442–447, doi: 10.1007/s11899-017-0414-x.
  47. Koh, S.P.; Yip, S.P.; Lee, K.K.; Chan, C.C.; Lau, S.M.; Kho, C.S.; Lau, C.K.; Lin, S.Y.; Lau, Y.M.; Wong, L.G.; Au, K.L.; Wong, K.F.; Chu, R.W.; Yu, P.H.; Chow, E.Y.; Leung, K.F.; Tsoi, W.C.; Yung, B. Genetic association between germline JAK2 polymorphisms and myeloproliferative neoplasms in Hong Kong Chinese population: A case–control study. *BMC Genet.* **2014**, *15*, 1–12, doi: 10.1186/s12863-014-0147-y.
  48. Hinds, D.A.; Barnholt, K.E.; Mesa, R.A.; Kiefer, A.K.; Do, C.B.; Eriksson, N.; Mountain, J.L.; Francke, U.; Tung, J.Y.; Nguyen, H.; Zhang, H.; Gojenola, L.; Zehnder, J.L.; Gotlib, J. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood*. **2016**, *128*, 1121–1128, doi: 10.1182/blood-2015-06-652941.
  49. Owen, K.L.; Brockwell, N.K.; ParkerImmune, B.S. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers*. **2019**, *11*, 1–26, doi:10.3390/cancers11122002.
  50. Ferrer-Marín, F.; Cuenca-Zamora, E.J.; Guijarro-Carrillo, P.J.; Teruel-Montoya, R. Emerging role of neutrophils in the thrombosis of chronic myeloproliferative neoplasms. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–14, doi: 10.3390/ijms22031143.
  51. Landolfi, R.; Di Gennaro, L. Pathophysiology of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. **2011**, *96*, 183–186, doi: 10.3324/haematol.2010.038299.
  52. Wang, W.; Liu, W.; Fidler, T.; Wang, Y.; Tang, Y.; Woods, B.; Welch, C.; Cai, B.; Silvestre-Roig, C.; Ai, D.; Yang, Y.G.; Hidalgo, A.; Soehnlein, O.; Tabas, I.; Levine, R.L.; Tall, A.R.; Wang, N. Macrophage inflammation, erythrophagocytosis, and accelerated atherosclerosis in JAK2V617F mice. *Circ. Res.* **2018**, *123*, 35–47, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313283.
  53. Marin Oyarzún, C.P.; Heller, P.G. Platelets as mediators of thromboinflammation in chronic myeloproliferative neoplasms. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–9, doi: 10.3389/fimmu.2019.01373.



54. Vannucchi, A.M.; Guglielmelli, P. What are the current treatment approaches for patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia?. *Hematology*. **2017**, *1*, 480–488, doi: 10.1182/asheducation-2017.1.480.
55. Wolach, O.; Abulafia, A.S. Can Novel Insights into the Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasm-Related Thrombosis Inform Novel Treatment Approaches?. *Hemato*. **2021**, *2*, 305–328, doi: 10.3390/hemato2020018.
56. Marín, C.P.; Glembotsky, A.C.; Goette, N.P.; Lev, P.R.; de Luca, G.; Baroni, M.C.; Moiraghi, B.; Castro, M.A.; Vicente, A.; Marta, R.F.; Schattner, M.; Heller, P.G. Platelet Toll-Like Receptors Mediate Thromboinflammatory Responses in Patients With Essential Thrombocythemia. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–12, doi: 10.3389/fimmu.2020.00705.
57. Di Rosa, M.; Giallongo, C.; Romano, A.; Li Volti, G.; Musumeci, G.; Barbagallo, I.; Castrogiovanni, P.; Palumbo, G.A. Immunoproteasome genes are modulated in CD34+ JAK2V617F mutated cells from primary myelofibrosis patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–19, doi: 10.3390/ijms21082926.
58. Davis, Z.; Felices, M.; Lenvik, T.; Badal, S.; Walker, J.T.; Hinderlie, P.; Riley, J.L.; Vallera, D.A.; Blazar, B.R.; Miller, J.S. Low-density PD-1 expression on resting human natural killer cells is functional and upregulated after transplantation. *Blood adv.* **2021**, *5*, 1069–1080, doi: 10.1182/bloodadvances.2019001110.
59. Perner, F.; Perner, C.; Ernst, T.; Heidel, F.H. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells*. **2019**, *8*, 1–19, doi:10.3390/cells8080854.
60. Prestipino, A.; Emhardt, A.J.; Aumann, K.; O’Sullivan, D.; Gorantla, S.P.; Duquesne, S.; Melchinger, W.; Braun, L.; Vuckovic, S.; Boerries, M.; Busch, H.; Halbach, S.; Pennisi, S.; Poggio, T.; Apostolova, P.; Veratti, P.; Hettich, M.; Niedermann, G.; Bartholomä, M.; Shoumariyeh, K.; Jutzi, J.S.; Wehrle, J.; Dierks, C.; Becker, H.; Schmitt-Graeff, A.; Follo, M.; Pfeifer, D.; Rohr, J.; Fuchs, S.; Ehl, S.; Hartl, F.A.; Minguet, S.; Miething, C.; Heidel, F.H.; Kröger, N.; Trivai, I.; Brummer, T.; Finke, J.; Illert, A.L.; Ruggiero, E. Oncogenic JAK2V617F causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med.* **2019**, *10*, 1–25, doi: 10.1126/scitranslmed.aam7729.Oncogenic.
61. Ginzburg, Y.Z.; Feola, M.; Zimran, E.; Varkonyi, J.; Ganz, T.; Hoffman, R. Dysregulated iron metabolism in polycythemia vera : Etiology and consequences. *Leukemia*. **2018**, *32*, 2105–2116, doi: 10.1038/s41375-018-0207-9.

62. Allain-Maillet, S.; Bosseboeuf, A.; Mennesson, N.; Bostoën, M.; Dufeu, L.; Choi, E.H.; Cleyrat, C.; Mansier, O.; Lippert, E.; Le Bris, J.; Gombert, J.M.; Girodon, F.; Pettazzoni, M.; Bigot-Corbel, E.; Hermouet, S. Anti-Glucosylsphingosine Autoimmunity, JAK2V617F-Dependent Interleukin-1 $\beta$  and JAK2V617F-Independent Cytokines in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers*. **2020**, *12*, 1–24, doi:10.3390/cancers12092446.
63. Hermouet, S.; Bigot-Corbel, E.; Gardie, B. Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation. *Mediators Inflamm*. **2015**, 1-16, doi: 10.1155/2015/145293.
64. Oyarzún, C.; Carestia, A.; Lev, P.R.; Glembotsky, A.C.; Castro, M.A.; Moiraghi, B.; Molinas, F.C.; Marta, R.F.; Schattner, M.; Heller, P.G. Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–13, doi: 10.1038/srep38738.
65. Wolach, O.; Sellar, R.S.; Martinod, K.; Cherpokova, D.; McConkey, M.; Chappell, R.J.; Silver, A.J.; Adams, D.; Castellano, C.A.; Schneider, R.K.; Padera, R.F.; DeAngelo, D.J.; Wadleigh, M.; Steensma, D.P.; Galinsky, I.; Stone, R.M.; Genovese, G.; McCarroll, G.A.; Iliadou, B.; Hultman, C.; Neuberg, D.; Mullally, A.; Wagner, D.D.; Ebert, B.L. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, 1–11, doi: 10.1126/scitranslmed.aan8292.
66. Oh, S.T. Neutralize the neutrophils! Neutrophil  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 integrin activation contributes to JAK2-V617F-driven thrombosis. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 4248–4250, doi: 10.1172/JCI123388.
67. Gupta, N.; Edelmann, B.; Schnoeder, T.M.; Saalfeld, F.C.; Wolleschak, D.; Kliche, S.; Schraven, B.; Heidel, F.H.; Fischer, T. JAK2-V617F activates  $\beta$ 1-integrin-mediated adhesion of granulocytes to vascular cell adhesion molecule. *Leukemia*. **2017**, *31*, 1223–1226, doi: 10.1038/leu.2017.26.
68. Edelmann, B.; Gupta, N.; Schnoeder, T.M.; Oelschlegel, A.M.; Shahzad, K.; Goldschmidt, J.; Philipsen, L.; Weinert, S.; Ghosh, A.; Saalfeld, F.C.; Nimmagadda, S.C.; Müller, P.; Braun-Dullaeus, R.; Mohr, J.; Wolleschak, D.; Kliche, S.; Amthauer, H.; Heidel, F.H.; Schraven, B.; Isermann, B.; Müller, A.J.; Fischer, T. JAK2-V617F promotes venous thrombosis through  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 integrin activation. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 4359–4371, doi: 10.1172/JCI90312.

69. Haage, T.R.; Müller, A.J.; Arunachalam, P.; Fischer, T. Reveal the Neutrophil: Elucidating the Role of a Neutrophil-Specific JAK2-V617F Mutation. *Blood*. **2019**, *134*, 2965, doi: 10.1182/blood-2019-122660.
70. Gaertner, F.; Massberg, S. Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity. *Semin. Immunol.* **2016**, *28*, 561–569, doi: 10.1016/j.smim.2016.10.010.
71. Shi, C.; Yang, L.; Braun, A.; Anders, H.J. Extracellular DNA—A Danger Signal Triggering Immunothrombosis. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–15, doi: 10.3389/fimmu.2020.568513.
72. Yang, J.; Wu, Z.; Long, Q.; Huang, J.; Hong, T.; Liu, W.; Lin, J. Insights Into Immunothrombosis: The Interplay Among Neutrophil Extracellular Trap, von Willebrand Factor, and ADAMTS13. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–16, doi: 10.3389/fimmu.2020.610696.
73. McKenna, E.; Mhaonaigh, A.U.; Wubben, R.; Dwivedi, A.; Hurley, T.; Kelly, L.A.; Stevenson, N.J.; Little, M.A.; Molloy, E.J. Neutrophils: Need for Standardized Nomenclature. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1–14, doi: 10.3389/fimmu.2021.602963.
74. Shaul, M.E.; Fridlender, Z.G. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils – subtypes, sources and function. *FEBS J.* **2018**, *285*, 4316–4342, doi: 10.1111/febs.14524.
75. Giese, M.A.; Hind, L.E.; Huttenlocher, A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*. **2019**, *133*, 2159–2167, doi: 10.1182/blood-2018-11-844548.
76. Masucci, M.T.; Minopoli, M.; Carriero, M.V. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1–16, doi: 10.3389/fonc.2019.01146.
77. Piccard, H.; Muschel, R.J.; Opdenakker, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2012**, *82*, 296–309, doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.06.004.
78. Podaza, E.; Risnik, D. Neglected players: Tumor associated neutrophils involvement in chronic lymphocytic leukemia progression. *Oncotarget.* **2019**, *10*, 1862–1863, doi: 10.18632/oncotarget.26716.
79. Castiglione, M.; Jiang, Y.P.; Mazzeo, C.; Lee, S.; Chen, J.S.; Kaushansky, K.; Yin, W.; Lin, R.Z.; Zheng, H.; Zhan, H. Endothelial JAK2V617F mutation leads to thrombosis, vasculopathy, and cardiomyopathy in a murine model of

- myeloproliferative neoplasm,” *J. Thromb. Haemost.*, **2020**, *18*, 3359–3370, doi: 10.1111/jth.15095.
80. Conran, N.; de Paula, E.V. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease – challenging the hemostatic balance. *Haematologica*. **2020**, *105*, 2380–2390, doi: 10.3324/haematol.2019.239343.
81. Poisson, J.; Tanguy, M.; Davy, H.; Camara, F.; El Mdawar, M.B.; Kheloufi, M.; Dagher, T.; Devue, C.; Plessier, J.A.; Merchant, S.; Blanc-Brude, O.; Souyri, M.; Mougnot, N.; Dingli, F.; Loew, D.; Hatem, S.N.; James, C.; Villeval, J.L.; Boulanger, C.M.; Rautou, P.E. Erythrocyte-derived microvesicles induce arterial spasms in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 2630–2643, doi: <https://www.jci.org/articles/view/124566>.
82. Murata, M. Inflammation and cancer. *Environ. Health Prev. Med.* **2018**, *23*, 1–8, doi: 10.1186/s12199-018-0740-1.
83. Lussana, F.; Rambaldi, A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J. Autoimmun.* **2017**, *85*, 1–6, doi: 10.1016/j.jaut.2017.06.010.
84. Arellano-Rodrigo, E.; Alvarez-Larra, A.; Reverter, J.C.; Colomer, D.; Villamor, N.; Bellosillo, B.; Cervantes, F. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK 2 V617F allele burden. *Am. J. Hematol.* **2008**, *84*, 102–108, doi: 10.1002/ajh.21338.
85. Kaifie, A.; Kirschner, M.; Wolf, D.; Maintz, C.; Hänel, M.; Gattermann, N.; Gökkurt, E.; Platzbecker, U.; Hollburg, W.; Göthert, J.R.; Parmentier, S.; Lang, F.; Hansen, R.; Isfort, S.; Schmitt, K.; Jost, E.; Serve, H.; Ehniger, G.; Berdel, W.E.; Brümmendorf, T.H.; Koschmieder, S. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): Analysis from the German SAL-MPN-registry. *J. Hematol. Oncol.* **2016**, *9*, 1–11, doi: 10.1186/s13045-016-0242-9.
86. Yonal-Hindilerden, I.; Daglar-Aday, A.; Akadam-Teker, B.; Yilmaz, C.; Nalcaci, M.; Yavuz, A.S.; Dargin, D. Mutations and JAK2V617F allele burden in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Blood Med.* **2015**, *6*, 157–176, doi: 10.2147/JBM.S78826.
87. Matsuura, S.; Thompson, C.R.; Belghasem, M.E.; Bekendam, R.H.; Piasecki, A.; Leiva, O.; Ray, A.; Italiano, J.; Yang, M.; Merrill-Skoloff, G.; Chitalia, V.C.; Flaumenhaft, R.; Ravid, K. Platelet dysfunction and thrombosis in JAK2V617F-

- mutated primary myelofibrotic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 262–272, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314760.
88. Greenfield, G.; McMullin, M.F.; Mills, K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol.* **2021**, *14*, 1–18, doi: 10.1186/s13045-021-01116-z.
89. Leimkuhler, N.B.; Gleitz, H.F.E.; Ronghui, L.; Snoeren, I.A.M.; Fuchs, S.N.R.; Nagai, J.S.; Banjanin, B.; Lam, K.H.; Vogl, T.; Kuppe, C.; Stalmann, U.S.A., Busche, G.; Kreipe, H.; Gutgemann, I.; Krebs, P.; Banz, Y.; Boor, P.; Wing-Yin Tai, E.; Brummendorf, T.H.; Koschmieder, S.; Crysandt, M.; Bindels, E.; Kramann, R.; Costa, I.G.; Schneider, R.K. Heterogeneous bone-marrow stromal progenitors drive myelofibrosis via a druggable alarmin axis. *Cell Stem Cell.* **2021**, *28*, 637–652, doi: 10.1016/j.stem.2020.11.004.
90. Goette, N.P.; Lev, P.R.; Heller, P.G.; Kornblihtt, L.I.; Korin, L.; Molinas, F.C.; Marta, R.F. Monocyte IL-2R $\alpha$  expression is associated with thrombosis and the JAK2V617F mutation in myeloproliferative neoplasms. *Cytokine.* **2010**, *51*, 67–72, doi: 10.1016/j.cyto.2010.04.011.
91. Margraf, A.; Zarbock, A. Platelets in Inflammation and Resolution. *J. Immunol.* **2019**, *203*, 2357–2367, doi: 10.4049/jimmunol.1900899.
92. Brostjan, C.; Oehler, R. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov.* **2020**, *6*, 1–8, doi: 10.1038/s41420-020-0255-6.
93. xun Wang, L.; xi Zhang, S.; Wu, H.J.; lu Rong, X.; Guo, J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J. Leukoc. Biol.* **2019**, *106*, 345–358, doi: 10.1002/JLB.3RU1018-378RR.
94. Molitor, D.C.; Boor, P.; Bunes, A.; Schneider, R.K.; Teichmann, L.L.; Körber, R.M.; Horvath, G.L.; Koschmieder, S.; Gütgemann, I. Macrophage frequency in the bone marrow correlates with morphologic subtype of myeloproliferative neoplasm. *Ann. Hematol.* **2021**, *100*, 97–104, doi: 10.1007/s00277-020-04304-y.
95. Larsen, T.S.; Christensen, J.H.; Hasselbalch, H.C.; Pallisgaard, N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* **2007**, *36*, 745–751, doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06497.x.
96. Nicolosi, M.; Mudireddy, M.; Gangat, N.; Pardanani, A.; Hanson, C.A.; Ketterling, R.P.; Tefferi, A. Normal karyotype in myelofibrosis: Is prognostic integrity affected

- by the number of metaphases analyzed?. *Blood Cancer J.* **2018**, *8*, 1–5, 2018, doi: 10.1038/s41408-017-0046-3.
97. Tefferi, A.; Nicolosi, M.; Mudireddy, M.; Lasho, T.L.; Gangat, N.; Begna, K.H.; Hanson, C.A.; Ketterling, R.P.; Pardanani, A. Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: Analysis based on 1002 informative patients. *Leukemia.* **2018**, *32*, 1189–1199, doi: 10.1038/s41375-018-0018-z.
98. Gonzalez-Rodriguez, A.P.; Villa-Álvarez, M.; Sordo-Bahamonde, C.; Lorenzo-Herrero, S.; Gonzalez, S. NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1–23, doi: 10.3390/jcm8101557.
99. Arantes, A.; Leal, C.; Araújo, C.; Santos, P.; Bergamo, A.; Welner, R.S.; Tenen, D.G.; Mullally, A.; Kobayashi, S.; Magalhaes, E.; Lobo, L. Decreased Activity of NK Cells in Myeloproliferative Neoplasms. *Blood.* **2015**, *126*, 1637, doi: 10.1182/blood.V126.23.1637.1637.
100. Palumbo, G.A.; Stella, S.; Pennisi, M.S.; Piroso, C.; Fermo, E.; Fabris, S.; Cattaneo, D.; Iurlo, A. The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1–10, doi: 10.3389/fonc.2019.00321.
101. Helbig, G. Classical Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: Focus on mutations and JAK2 inhibitors. *Med. Oncol.* **2018**, *35*, 1–7, doi: 10.1007/s12032-018-1187-3.
102. Skov, V. Next Generation Sequencing in MPNs. Lessons from the Past and Prospects for Use as Predictors of Prognosis and Treatment Responses. *Cancers.* **2021**, *12*, 1–38, doi:10.3390/cancers12082194.
103. Patnaik, M.M.; Lasho, T.L. Genomics of myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm overlap syndromes. *Hematology.* **2020**, *20*, 450–459, doi: 10.1182/HEMATOLOGY.2020000130.
104. Luque Paz, D.; Jouanneau-Courville, R.; Riou, J.; Ianotto, J.C.; Boyer, F.; Chauveau, A.; Renard, M.; Chomel, J.C.; Cayssials, E.; Gallego-Hernanz, M.P.; Pastoret, C.; Murati, A.; Courtier, F.; Rousselet, M.C.; Quintin-Roue, I.; Cottin, L.; Orvain, C.; Thepot, S.; Chretien, J.M.; Delneste, Y.; Ifrah, N.; Blanchet, O.; Hunault-Berger, M.; Lippert, E.; Ugo, V. Leukemic evolution of polycythemia vera and essential thrombocythemia: Genomic profiles predict time to transformation. *Blood adv.* **2020**, *4*, 4887–4897, doi: 10.1182/bloodadvances.2020002271.

105. Vannucchi, A.M. From leeches to personalized medicine: Evolving concepts in the management of polycythemia vera. *Haematologica*. **2017**, *102*, 18–29, doi: 10.3324/haematol.2015.129155.
106. Moliterno, A.; Kaizer, H. Applied genomics in MPN presentation. *Hematology*. **2020**, *2020*, 434–439, doi: 10.1182/hematology.2020000128.
107. Downes, C.E.J.; McClure, B.J.; Rehn, J.; Breen, J.; Bruning, J.B.; Yeung, D.T.; White, D.L. Acquired Mutations within the JAK2 Kinase Domain Confer Resistance to JAK Inhibitors in an in Vitro model of a High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. **2020**, *136*, 5–6, doi: 10.1182/blood-2020-133491.
108. Helbig, G.; Wichary, R.; Torba, K.; Kyrz-Krzemien, S. Resolution of thrombocytopenia, but not polycythemia after ruxolitinib for polycythemia vera with detectable mutation in the exon 12 of the JAK2 gene. *Med. Oncol*. **2017**, *34*, 31. [\[CrossRef\]](#)
109. Habbel, J.; Arnold, L.; Chen, Y.; Mollmann, M.; Bruderek, K.; Brandau, S.; Dührsen, U.; Hanoun, M. Inflammation-driven activation of JAK/STAT signaling reversibly accelerates acute myeloid leukemia in vitro. *Blood adv*. **2020**, *4*, 3000–3010, doi: 10.1182/bloodadvances.2019001292.
110. Forte, D.; Barone, M.; Palandri, F.; Catani, L. The “Vesicular Intelligence” Strategy of Blood Cancers. *Genes*. **2021**, *12*, 1–29, doi: 10.3390/genes12030416.
111. Garcia-Gisbert, N.; Fernandez-Ibarrondo, L.; Fernandez-Rodriguez, C.; Gibert, J.; Andrade-Campos, M.; Arenillas, L.; Camacho, L.; Angona, A.; Longaron, R.; Salar, A.; Calvo, X.; Besses, C.; Bellosillo, B. Circulating cell-free DNA improves the molecular characterization of Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Br. J. Haematol*. **2021**, *192*, 300–309, doi: 10.1111/bjh.17087.
112. Găman, M.A.; Cozma, M.A.; Dobrică, E.C.; Cretoiu, S.M.; Găman, A.M.; Diaconu, C.C. Liquid Biopsy and Potential Liquid Biopsy-Based Biomarkers in Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: A Systematic Review. *Life*. **2021**, *11*, 1–23, doi: 10.3390/life11070677.

## **Capítulo II:**

### **Panorama molecular do *JAK2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas do Estado do Amazonas**

**Artigo original a ser submetido na revista *Scientific Reports***

(ISSN 2045-2322)

Fator de Impacto: 4.38

Qualis CAPES A1



## Panorama molecular da JAK2 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas do Estado do Amazonas

Dania G. Torres<sup>1</sup>, Allyson G. da Costa<sup>1,2,5</sup>, Nelson A. Fraiji<sup>1</sup>, Adriana Malheiro<sup>1,2,5</sup>, George A. V. Silva<sup>1,3,4,5</sup>, Lucivana P. de Souza Mourão<sup>1</sup> and Andréa M. Tarragô<sup>1,2,5\*</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus 69850-000, AM, Brazil.

2 Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus 69067-005, AM, Brazil.

3 Fundação Oswaldo Cruz–Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz), Manaus 69027-070, AM, Brazil.

4 Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), Manaus 69040-010, AM, Brazil.

5 Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Manaus, AM, Brazil

\* Autor correspondente: Andrea M. Tarragô, PhD, Laboratório de Genômica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Av. Constantino Nery, 4397 - Chapada, Manaus - AM, Cep.: 69050-001, Telefone: +55-92-991360001, E-mail: [andrea\\_s\\_monteiro@hotmail.com](mailto:andrea_s_monteiro@hotmail.com)

*JAK2V617F* (dbSNP: *rs77375493*) é a variante mais frequente e mais estudada nas neoplasias *BCR/ABL1* negativo, seguida de variantes no éxon 12 do gene *JAK2*. O estudo visou caracterizar molecularmente variantes no gene *JAK2* em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR/ABL1* negativo. O estudo incluiu 75 pacientes com neoplasias mieloproliferativas *BCR/ABL1* negativo: Policitemia vera (n=29), Trombocitemia essencial (n=44) e Mielofibrose (n=2). Realizou-se avaliação molecular mediante Reação em cadeia de Polimerase convencional e Sequenciamento de Sanger para detecção de variantes na região codificante completa do gene *JAK2*. Sequenciamento de Sanger demonstrou a presença de *rs907414891*, *rs2230722*, *rs2230723*, *rs10119726*, *rs576746768*, *rs77375493* (*JAK2V617F*), *rs2230728*, *rs2230724*, *rs41316003* e *rs55930140* na região codificante do gene *JAK2*. Coexistência de variantes detectou-se na policitemia vera e na trombocitemia essencial, sendo a combinação de variantes *rs2230722* / *rs77375493* / *rs2230724* a mais predominante. Assim, indivíduos com Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo com as variantes *rs2230724*, *rs2230722* e *rs77375493* tanto separada como conjuntamente evidenciam alterações discretas no perfil clínico-laboratorial, especialmente em

concomitância com a variante *rs77375493*, demonstrando envolvimento na instabilidade de mecanismos regulatórios a nível proteico e possivelmente no fenótipo mieloproliferativo.

Palavras chaves: *JAK2*, neoplasias mieloproliferativas crônicas, Região Codificante, Sequenciamento de Sanger.

As Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo (NMP) representam um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula progenitora hematopoiética, sendo as mais clássicas: Policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibroose primária (MFP)<sup>1,2</sup>. Estas doenças hematológicas são caracterizadas por incrementada proliferação celular, desenvolvimento de inflamação crônica e associação com Hematopoiese clonal<sup>1,3,4</sup>.

Rearranjos genéticos na via JAK/STAT são as principais causas de desenvolvimento de Neoplasias Mieloproliferativas crônicas<sup>5</sup>. Variantes nos genes drivers: *JAK2*, *CALR* e *MPL* são as mais associadas ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo<sup>6</sup>. O gene *JAK2* localiza-se no cromossomo 9, locus p24.1. O gene completo é constituído de 145,559 nucleotídeos, distribuídos em 27 éxons, sendo que sequência codificante de *JAK2* tem uma extensão de 3 399 nucleotídeos, distribuída em 23 éxons, a partir do éxon 3 até o éxon 25, que codifica uma proteína de 1132  $\alpha$ . aminoácidos, de tipo tirosina quinase não receptora, denominada *JAK2*.

A maioria de variantes identificadas em *JAK2* resultam em ganho de função, caracterizadas como somáticas de tipo missense que conduzem a produção desregulada de células hematopoiéticas na medula óssea e acumulação de células maduras no sangue periférico<sup>7</sup>. *JAK2V617F* (dbSNP: *rs77375493*) é a variante mais identificada nas NMP, encontrando-se até em 95% na PV e entre 50-60% na TE e MFP<sup>8</sup>. A variante localiza-se no éxon 14 do gene *JAK2* e caracteriza-se como uma variante de tipo missense, produto da substituição de uma guanina por uma timina na posição 1849, que resulta na leitura de uma Valina em lugar de uma Fenilalanina na posição 617 da estrutura proteica<sup>9,10</sup>, posição que pertence ao domínio Pseudoquinase, região de principal regulação positiva e negativa da proteína<sup>10,11</sup>.

Variantes no éxon 12 do gene *JAK2* são identificadas em aproximadamente 3% dos pacientes negativos para *JAK2V617F*<sup>12</sup>. Alterações genéticas neste éxon incluem variações de tipo missense e indels<sup>13</sup>, as quais conferem um quadro de eritrocitose marcada em indivíduos com PV, apresentando-se em idades menores comparadas à variante *JAK2V617F*<sup>14</sup>.

Apesar de que *JAK2V617F* e variantes no éxon 12 são as mais identificadas e descritas em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo; aplicação de sequenciamento de Sanger e Sequenciamento de Nova Geração tem permitido identificar variantes em outros éxons de *JAK2*<sup>15,16</sup>, especialmente na extensão da região codificante completa de *JAK2*, que atingem outros domínios da proteína *JAK2*<sup>16,17</sup> e segundos estudos funcionais, levam à ativação constitutiva de JAK/STAT, sendo que a maioria das variantes descritas são somáticas, enquanto que uma pequena fração delas são germinativas, sendo que este último achado poderia sugerir que alguns pacientes podem desenvolver um fenótipo mieloproliferativo não clonal, com penetrância variável a nível familiar<sup>18</sup>.

Algumas variantes adquiridas na secção codificante de *JAK2* são descritas como benignas ou de significado clínico incerto, sendo que entre os principais éxons afetados encontram-se os éxons 6<sup>19</sup>, 9-10<sup>20</sup>, 11-15<sup>16</sup>, e 19<sup>21</sup>. Segundos estudos, algumas variantes nestas regiões tem sido encontradas em coexistência, apresentando sinalização independente de citocinas<sup>22</sup>, e que inclusive associam-se a transformação leucêmica e desenvolvimento de tumores sólidos não hematológicos<sup>20,21,23</sup>. Assim, o presente estudo visou caracterizar molecularmente variantes na região codificante do gene *JAK2* em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo.

## Resultados

### **Características clínicas e laboratoriais de pacientes com NMP *BCR/ABL1* negativo.**

Foram avaliadas 75 amostras de indivíduos diagnosticados com NMP, distribuídos em PV (n=29), TE (n=44) e MF (n=2). Clinicamente, PV apresentou predomínio do sexo masculino (16/29), enquanto que na TE o predomínio foi mais frequente na população feminina (33/44), (p=0.009). Os casos de MF distribuíram-se de forma equivalente.

Acerca da idade, as 3 neoplasias apresentaram faixa etária entre a quinta e sexta década da vida (p=0.330). Esplenomegalia foi detectada em maior frequência na PV do

que na TE (27.5% e 18.1%,  $p=0.341$ ) respectivamente. Eventos cardiovasculares foram mais registrados em indivíduos com PV (17.2%) comparado com aqueles com TE ( $p=0.071$ ). No histórico de eventos cardiovasculares citam-se: Falência cardíaca, infarte, hipertensão arterial pulmonar, acidente cerebrovascular e síndrome Budd-Chiari.

Em contraste, eventos trombóticos e hemorrágicos foram mais descritos em casos de TE (18.1% e 25%,  $p=0.170$  e  $p=0.0047$ ) respectivamente comparado com PV. Entre os eventos trombóticos avaliados, mencionam-se: venose trombose profunda, trombose de vena esplênica e varizes esofágicas, enquanto que os eventos hemorrágicos avaliados no estudo foram: hipermenorragia, hemorragia ocular e gingival, hemorragia do trato gastrointestinal e aborto espontâneo.

Quanto ao hemograma, observou-se aumento da linhagem eritrocitária em indivíduos com PV comparado com aqueles com TE, apresentando RBC aumentado ( $4.6 \times \text{mm}^3$ ,  $p=0.0003$ ), achado este que complementa-se com índices de Hto (46.9 %,  $p < 0.0001$ ) e Hba (14.7 g/dL,  $p= 0.0001$ ). Índices hematimétricos acharam-se aumentados na TE (VCM: 103.9 fL,  $p=0.018$ ; HCM: 33.5,  $p=0.008$  e CHCM: 32.4,  $p=0.036$ ) comparado com PV. WBC encontrou-se dentro de intervalos normais nas neoplasias em questão ( $p=0.004$ ), contudo a porcentagem de neutrófilos foi maior na PV (68%,  $p=0.048$ ) comparado com a TE; enquanto que percentual de linfócitos foi maior na TE do que na PV (29.1%,  $p=0.001$ ). Na TE, observou-se alta contagem plaquetária ( $468500 \times \text{mm}^3$ ,  $p=0.0002$ ), comparado com PV.

Valores no coagulograma de indivíduos com PV, TE e MF foram estreitamente relativos; no entanto, observou-se leve incremento nas concentrações de fibrinogênio nos indivíduos com MF (368 mg/dL). Análises bioquímicas demonstraram maiores concentrações de DHL e AU em indivíduos com MF (883.9 U/L e 6.7 mg/dL; respectivamente) comparado com PV e TE. Presença de variantes no gene *JAK2* predominou levemente em indivíduos com PV comparado com aqueles com aqueles com TE (93.1% e 90.9%) respectivamente. Características clínicas e laboratoriais são descritas na tabela 1.

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes (n=75)

Características	PV (n=29)	TE (n=44)	MF (n=2)	<i>p value</i>
Homens/ Mulheres, n	16/13	11/33	1/1	<b>0.009</b>
Idade, M <sub>d</sub> [ IIQ ]	61 [48-72]	56.5 [48-72]	66 [54-78]	0.330
RBC (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	4.6 [4.11-5.9]	3.8 [3.2-4.5]	4.3 [3.6-5.1]	<b>0.0003</b>
Hto (%), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	46.9 [42.1-50.5]	38 [35.8-42.7]	36.9 [33.5-40.4]	<b>&lt; 0.0001</b>
Hba (g/dL), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	14.7 [13.6-16.1]	12.8 [11.6-13.9]	11.7 [11.1-12.3]	<b>0.0001</b>
VCM (fL), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	93.7 [83.8-104.3]	103.9 [92.3-112.9]	86.1 [79.2-93.1]	<b>0.018</b>
HCM (pg), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	30.9 [27.6-33.3]	33.5 [30.2-36.7]	27.4 [24.1-30.8]	<b>0.008</b>
CHCM (g/dL), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	31.6 [30.3-33.3]	32.4 [32-33.5]	31.7 [30.4-33.1]	<b>0.036</b>
WBC (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	6540 [5430-7985]	5210 [3915-6990]	7205 [4360-10050]	<b>0.004</b>
Neutrófilos (%), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	68 [60.2-74.1]	62.7 [56.8-68.3]	68.4 [63-73.8]	<b>0.048</b>
Linfócitos (%), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	21.5 [17.4-28.1]	29.1 [22.6-34.6]	15.4 [11-19.9]	<b>0.001</b>
Monócitos (%), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	5 [3.6-6.6]	5.1 [4.1-6]	1.9 [1-2]	0.873
Plaquetas (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	302000 [168500-430000]	468500 [366750-534750]	439000 [356000-522000]	<b>0.0002</b>
DHL (U/L), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	439.8 [317.8-561.3]	427.7 [380.9-507.7]	883.9 [483.1-1285]	0.853
Ácido Úrico (mg/dL), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	4.4 [3.4-5.6]	4.1 [2.7-4.1]	6.7 [5.7-7.7]	0.177
PT (seg), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	11.6 [10.9-11.7]	11.6 [11.1-12.3]	13.4 [12.8-14.1]	0.838
INR, M <sub>d</sub> [ IIQ ]	0.9 [0.9-1.0]	0.9 [0.9-1.0]	1.1 [1.1-1.2]	0.847
aPTT (seg), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	32.7 [27.9-37.3]	31.4 [28.1-33.9]	35.9 [34.3-37.5]	0.248
Fibrinogênio (mg/dL), M <sub>d</sub> [ IIQ ]	275 [221-320]	289 [206-343.8]	368 [190-546]	0.647
Esplenomegalia, n (%)	8 (27.5)	8 (18,1)	1 (50)	0.341
Eventos cardiovasculares, n (%)	5 (17.2)	2 (0.5)	0	0.071
Eventos trombóticos, n (%)	2 (6.8)	8 (18.1)	0	0.170
Eventos hemorrágicos, n (%)	2 (6.8)	11 (25)	0	0.047
Tratamento com HU, n (%)	23 (79.3)	41 (93.1)	0	<b>0.077</b>
Tratamento com Anagrelida n (%)	0	3 (6.8)	1	0.151
Terapia com Flebotomia, n (%)	5 (17.2)	0	0	<b>0.004</b>
JAK2-variante	27 (93.1)	40 (90.9)	1	0.738

Abreviações. PV: Policitemia vera, TE: Trombocitemia Essencial, MF: Mielofibrose, RBC: Contagem de eritrócitos, Hto: Hematócrito, Hba: Hemoglobina, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, WBC: Contagem de leucócitos, DHL: Lactato Desidrogenase, PT-INR: Tempo de Protrombina- Razão Internacional Normalizada, aPTT: Tempo de Tromboplastina Parcial ativada, HU: Hidroxiuréia, IIQ: Intervalo interquartil, M<sub>d</sub>: Mediana.

**Variantes detectadas por Sequenciamento de Sanger em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas.** Identificaram-se 2 variantes que atingem o domínio FERM (*rs907414891* e *rs2230722*), 1 variante entre a região de ligação FERM-SH2 (*rs2230723*), 1 variante no domínio SH2 (*rs10119726*), 1 variante entre a região de ligação SH2-JH2 (*rs576746768*), 2 variantes que atingem o domínio pseudoquinase (*rs77375493* e *rs2230728*), 1 variante entre a região de ligação JH1-JH2 (*rs2230724*) e 2 variantes no domínio quinase (*rs41316003* e *rs55930140*); totalizando 10 variantes identificadas na região codificante completa do gene *JAK2*, descritas no quadro 1.

**Quadro 1.** Variantes detectadas por Sequenciamento de Sanger na região codificante do JAK2 em pacientes com NMP (n=75).

Variante	Alelo	Varição no cDNA	Localização no éxon	Varição na proteína	Domínio afetado	Alteração Funcional	Significado clínico*	Tipo de variante*
<i>rs2230722</i>	C>T	c.489	6	(p.His163=)	FERM	Sinônima, sem evidência funcional registrada	Benigna	Somática
<i>rs907414891</i>	A>G	c.496	6	(p.Ile166Val)	FERM	<i>Missense</i> , sem evidência funcional registrada	Sem descrição	Somática
<i>rs2230723</i>	C>G	c.1177	9	(p.Leu393Val)	FERM-SH2	<i>Missense</i> , sem evidência funcional registrada	Significado clínico incerto	Germinativa
<i>rs10119726</i>	T>G	c.1458	11	(p.Val486=)	SH2	Sinônima, sem evidência funcional registrada	Benigna	Somática
<i>rs576746768</i>	T>C	c.1545	12	(p.Asn515=)	SH2-JH2	Sinônima, sem evidência funcional registrada	Sem descrição	Somática
<i>rs77375493</i>	G>T	c.1849	14	(p.Val617Fen)	Pseudoquinase	<i>Missense</i> , ganho de função	Patogênica	Somática
<i>rs2230728</i>	T>C	c.1929	15	(p.Asn643=)	Pseudoquinase	Sinônima, sem evidência funcional registrada	Benigna	Somática
<i>rs2230724</i>	G>A	c.2490	19	(p.Leu830=)	JH1-JH2	Sinônima, sem evidência funcional registrada	Benigna	Somática
<i>rs41316003</i>	G>A	c.3188	24	(p.Arg1063His)	Quinase	<i>Missense</i> , sem evidência funcional registrada	Benigna	Germinativa
<i>rs55930140</i>	G>A	c.2931	24	(p.Leu977=)	Quinase	Sinônima, sem evidência funcional registrada	Benigna	Somática

\* Significado clínico foi descrito de acordo aos reportes da Clinvar. Tipo de variante foi descrito de acordo aos reportes da dbSNP. = significa ausência de troca em aminoácidos.

**Frequência e distribuição de variantes em pacientes com alelos variantes do gene *JAK2*.** Frequência de variantes foi estimada na população com alelos variantes em *JAK2* (PV=27, TE=40 e MF=1), observando-se que a maioria delas localizam-se nos primeiros domínios proteicos, atingindo especialmente o domínio FERM, seguido do domínio pseudoquinase. Daí que, a variante *rs2230722* apresentou um predomínio discreto em indivíduos com PV comparado com aqueles com TE (81.4% e 70%,) respectivamente, enquanto que a variante *rs2230724* foi detectada em indivíduos com PV e TE em equivalência. Variante *rs77375493* (*JAK2V617F*) apresentou alta frequência em indivíduos com PV comparado com aqueles com TE (59.2% e 20%) respectivamente.

Variantes *rs2230723*, *rs907414891*, *rs41316003*, *rs576746768*, *rs55930140* e *rs2230728* foram encontradas em casos esporádicos de TE, mas não na PV nem MF. Em contraste, *rs10119726* foi exclusivamente encontrada na PV (1 caso). Frequência de variantes é representada na tabela 2.

Tabela 2. Frequência e distribuição de variantes em pacientes.

Variante	PV (n=27)	TE (n=40)	MF (n=1)
<i>rs2230722</i> , n (%)	22 (81.4)	28 (70)	1
<i>rs2230723</i> , n (%)	0	1 (2.5)	0
<i>rs2230724</i> , n (%)	24 (88.8)	35 (87.5)	1
<i>rs77375493</i> , n (%)	16 (59.2)	8 (20)	1
<i>rs2230728</i> , n (%)	0	3 (7.5)	0
<i>rs907414891</i> , n (%)	0	1 (2.5)	0
<i>rs41316003</i> , n (%)	0	1 (2.5)	0
<i>rs576746768</i> , n (%)	0	1 (2.5)	0
<i>rs10119726</i> , n (%)	1 (2.7)	0	0
<i>rs55930140</i> , n (%)	0	1 (2.5)	0

Abreviações. PV: Policitemia vera, TE: Trombocitemia Essencial, MF: Mielofibrose.



**Panorama mutacional e perfil laboratorial de variantes somáticas do gene *JAK2* em indivíduos com PV e TE.** Após estimação da frequência de variantes na região codificante completa do gene *JAK2*, decidiu-se traçar o perfil mutacional dos indivíduos, observando que os pacientes com alelos variantes em *JAK2* apresentaram de uma até 3 variantes simultaneamente. Entre as principais variantes encontradas simultaneamente nas três neoplasias mieloproliferativas citam-se *rs2230724*, *rs2230722* e *rs77375493*, destacando que a maioria de indivíduos com PV apresentaram as três variantes comparado com aqueles com TE. Em contraste, indivíduos com TE apresentaram predomínio de duas variantes comparado com aqueles com PV. As demais variantes apresentaram combinações com distribuição heterogênea entre as neoplasias avaliadas.

Comparou-se o perfil laboratorial de indivíduos com PV e TE com variantes em *JAK2*, considerando o perfil mutacional frequente em ambos grupos; entre as quais destacaram: *rs2230724*, *rs2230722/rs2230724* e *rs2230722/rs77375493/rs2230724*. Nos indivíduos com PV com a combinação de variantes *rs2230722/rs77375493/rs2230724* (em concomitância) observou-se Hto e VCM aumentado (47% e 100.4 fL,  $p=0.667$  e  $p=0.384$ ) respectivamente, comparado com aqueles com PV que apresentaram somente a variante *rs2230724*, os quais apresentaram concentrações de Hba aumentadas (15.3 g/dL,  $p=0.947$ ). RBC foi relativo entre os três grupos de combinações (4.5, 4.8, 4.4 x mm<sup>3</sup>,  $p=0.902$ ). Níveis de HCM e WBC foram menores nos indivíduos com a variante *rs2230724*, contudo estes dados não foram estatisticamente significativos ( $p=0.861$  e  $p=0.596$ ) respectivamente. De igual forma aqueles que apresentaram somente a variante *rs2230724* exibiram menores contagens plaquetárias, sem significância estatística ( $p=0.314$ ).

Acerca das características clínicas, equivalência relativa entre mulheres e homens com PV observou-se com as três variantes (*rs2230722/rs77375493/rs2230724*), sem significância estatística ( $p=0.586$ ). Igualmente, este grupo registrou maior número de eventos cardiovasculares (4 indivíduos,  $p=0.236$ ) comparado com os outros 2 grupos de variantes, dados descritos na tabela 3. Em contraste do grupo de PV; indivíduos com TE que apresentaram a combinação de variantes *rs2230722/rs77375493/rs2230724*, apresentaram RBC, Hto e Hba aumentada (5.1 x mm<sup>3</sup>,  $p=0.003$ ; 47.8%,  $p=0.007$  e 15.5 g/dL,  $p=0.004$ ) respectivamente, comparado com aqueles com TE que apresentaram somente a variante *rs2230724* ou a combinação *rs2230722/rs2230724*. Contrariamente da PV, indivíduos com TE que apresentaram somente a variante *rs2230724*, manifestaram

valores aumentados de VCM e HCM (106.8 fL,  $p=0.038$  e 35.2 pg,  $p=0.027$ ). No mesmo grupo (variante rs2230724) observou-se WBC diminuído (4490 x mm<sup>3</sup>,  $p=0.823$ ) e contagem plaquetária maior (472000 x mm<sup>3</sup>,  $p=0.186$ ). De forma interessante, maior número de mulheres apresentaram as variantes rs2230722/rs2230724 em concomitância, assim como maior número de episódios trombo-hemorrágicos. Ver dados na tabela 4.

**Tabela 3.** Perfil laboratorial de indivíduos com Policitemia vera com variantes no gene *JAK2*.

Características	<i>rs2230724</i> (n=3)	<i>rs2230722</i> / <i>rs2230724</i> (n=6)	<i>rs2230722</i> / <i>rs77375493</i> / <i>rs2230724</i> (n=15)	<i>p value</i>
Homens/Mulheres, n	2 / 1	2 / 4	8 / 7	0.586
Eventos cardiovasculares, n (%)	0	0	4	0.236
Eventos trombóticos, n (%)	0	1	1	0.646
Eventos hemorrágicos, n (%)	0	1	0	0.209
RBC (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [IIQ]	4.5 [4.4-5.7]	4.8 [3.8-5.7]	4.44 [3.8-5.8]	0.902
Hto (%), M <sub>d</sub> [IIQ]	42.4 [40.1-49]	44.8 [39.8-51.2]	47 [42.8-50.4]	0.667
Hb (g/dL), M <sub>d</sub> [IIQ]	15.3 [13-16.2]	14.5 [13.4-17.6]	14.8 [13.7-15.8]	0.947
VCM (fL), M <sub>d</sub> [IIQ]	90.3 [84.8-92.4]	95.9 [87.6-102.8]	100.4 [82.6-106.3]	0.384
HCM (pg), M <sub>d</sub> [IIQ]	29.3 [28-33.3]	31.6 [29.6-33.9]	31.5 [28.1-34.8]	0.861
WBC (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [IIQ]	6480 [3680-6860]	7175 [5810-8025]	6540 [5620-9900]	0.596
Plaquetas (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [IIQ]	166000 [156000-488000]	298000 [163750-347000]	384000 [246000-559000]	0.314

Abreviações. PV: Policitemia vera, RBC: Contagem eritrocitária, Hto: Hematócrito, Hba: Hemoglobina, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, WBC: Contagem de leucócitos, IIQ: Intervalo interquartilico, M<sub>d</sub>: Mediana.

**Tabela 4.** Perfil laboratorial de indivíduos com Trombocitemia essencial variantes no gene *JAK2*.

Características	<i>rs2230724</i> (n=7)	<i>rs2230722</i> / <i>rs2230724</i> (n=15)	<i>rs2230722</i> / <i>rs77375493</i> / <i>rs2230724</i> (n=4)	<i>p value</i>
Homens/Mulheres, n	1 / 6	4 / 11	1 / 3	0.809
Eventos cardiovasculares, n (%)	0	1	0	0.683
Eventos trombóticos, n (%)	1	4	2	0.437
Eventos hemorrágicos, n (%)	2	3	1	0.901
RBC (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [RIQ]	3.2 [3.0-3.4]	3.8 [3.2-4.3]	5.1 [4.7-6.5]	<b>0.003</b>
Hto (%), M <sub>d</sub> [IIQ]	35.8 [34.4-37.9]	40.2 [34.6-41.4]	47.80 [44.6-54.2]	<b>0.007</b>
Hb (g/dL), M <sub>d</sub> [IIQ]	11.6 [10.9-12.7]	12.9 [11.9-13.9]	15.5 [14.6-16.7]	<b>0.004</b>
VCM (fL), M <sub>d</sub> [IIQ]	106.8 [106.5-118.2]	100.5 [92.3-114.2]	88.2 [82.4-100.3]	<b>0.038</b>
HCM (pg), M <sub>d</sub> [IIQ]	35.2 [33.6-38.3]	33.3 [29.7-36.9]	29.9 [25.6-31.1]	<b>0.027</b>
WBC (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [IIQ]	4490 [3740-5370]	5130 [2980-6680]	5320 [3968-7115]	0.823
Plaquetas (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [IIQ]	472000 [397000-602000]	467000 [358000-534000]	333500 [167250-458500]	0.186

Abreviações. PV: Policitemia vera, RBC: Contagem eritrocitária, Hto: Hematócrito, Hba: Hemoglobina, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, WBC: Contagem de leucócitos, IIQ: Intervalo interquartilico, M<sub>d</sub>: Mediana.

## Discussão

As NMP geralmente caracterizam-se pelo aumento nas contagens celulares, que conduzem algumas vezes a evolução clonal e progressão da doença. Assim, nossos resultados demonstram relação direta com os indicadores estabelecidos pela OMS<sup>1</sup>, observando que o incremento da linhagem eritrocitária é de fato uma característica em indivíduos com PV e que o aumento na contagem plaquetária é um indicador sugestivo de TE. Embora aumentos de RBC sejam diretamente relacionados a concentrações de Hba e Hto, é considerado que estes dois últimos parâmetros hematológicos não constituem índices fidedignos na PV, devido à expansão plasmática que poderia mascarar o valor verdadeiro do Hto, especialmente em casos de PV em mulheres<sup>28</sup>.

De igual modo, destaca-se que NMP são associadas a alto risco de eventos trombóticos e tromboembólicos em comparação à população geral, associados a aumentadas contagens hematopoiéticas, especialmente em indivíduos com TE<sup>29</sup>. Embora administração de HU seja altamente utilizada em casos de PV e TE na normalização de contagens hematológicas, nossos resultados evidenciam que uma alta contagem plaquetária observada em indivíduos com TE apresenta relação direta com o aumento da frequência de eventos trombo-hemorrágicos, o que indica que as plaquetas poderiam ser de fato as principais mediadoras da ativação trombótica nestes pacientes. Assim, o estudo de Buxhofer-Ausch et al.<sup>30</sup> demonstrou que normalização da contagem plaquetária constitui um fator importante na redução do risco trombótico, independente da contagem leucocitária. No entanto, precisa-se de maiores estudos na confirmação de qual é o ponto de corte na contagem plaquetária para desencadear estes riscos.

Estudos propõem a normalização de PLT e WBC para reduzir o risco trombótico em indivíduos com NMP. Contudo, muitos deles não alcançam resposta hematológica completa, fato que poderia ser atribuído à presença de variantes no gene que não respondam adequadamente ao tratamento citorrredutor. *JAK2V617F* é a variante mais comum nas NMP *BCR/ABL1* negativo<sup>31</sup>, com atividade constitutiva da via JAK2/STAT5 e altamente associada ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares e trombóticas. No entanto complicações esofágicas e gástricas são descritas nestes pacientes<sup>32</sup>, geralmente devido a hipertensão de via do sistema porta ou síndrome de von Willebrand adquirida por excessiva trombocitose. No entanto, outras variantes no gene *JAK2* têm sido reportadas, sendo que a maioria destas variantes são de tipo somáticas<sup>18,19</sup>. A existência de variantes germinativas nas NMP também tem sido descrita, inclusive mostrando padrões de hipersensibilidade a eritropoietina (EPO) e sinalização constitutiva débil de JAK2/STAT5, comparado com *JAK2V617F*<sup>31</sup>. Desta forma,

mediante aplicação de Sequenciamento de Sanger na região codificante do gene *JAK2*, nosso estudo demonstrou a existência de variantes somáticas e germinativas em indivíduos com NMP distintas a *JAK2V617F*, sendo as variantes de tipo somático as mais frequentes; dados igualmente demonstrados por estudos prévios<sup>16,33,34</sup>.

Por outro lado, segundo dados disponíveis no site ClinVar-NCBI, uma fração de variantes adquiridas localizadas na extensão da região codificante de *JAK2* são benignas ou de significado clínico incerto, mencionando que a maioria das variantes reportadas até a atual data, localizam-se nos domínios FERM, quinase e regiões de ligações<sup>16,19,20,21</sup>, fato consideravelmente relacionado com nosso estudo, pois as variantes detectadas localizam-se nas regiões mencionadas.

Atualmente, o domínio FERM constitui um dos alvos mais relevantes nas NMP. Isto devido à dualidade de funções que tem sido descritas neste domínio: afinidade na ligação citocina-receptor e inibição da atividade quinase de *JAK2*<sup>35,36</sup>. Assim, destaca-se que a presença de variantes neste domínio poderia resultar em uma incrementada atividade basal de *JAK2*<sup>36</sup>, fenômeno que poderia explicar o fenótipo mieloproliferativo em indivíduos *JAK2V617F* negativos que apresentam outras variantes em *JAK2*, e que possivelmente poderia ter relação com o fenótipo clínico nos diferentes subtipos de neoplasias, fenômeno que até hoje não é bem esclarecido.

Desta forma, o SNV *rs2230722*, localizado no éxon 6 de *JAK2*, foi encontrado no nosso estudo em alta frequência e com alto predomínio em mulheres, dado igualmente demonstrado no estudo de Sokol et al.<sup>19</sup> cuja variante apresentou maior frequência em mulheres com Síndrome de agregação plaquetária comparado com homens; significativamente associado a trombose venosa profunda. Com isto, a variante que poderia ser correlacionada com o quadro clínico das NMP, especialmente em indivíduos com manifestação de complicações trombóticas.

Por outro lado, o SNV *rs2230724* foi detectado em nosso estudo, variante localizada no éxon 19 de *JAK2* e que atinge a região de ligação entre JH2-JH1. Apesar de que variantes nesta região não sejam altamente descritas nas NMP, alterações na interação JH1-JH2 poderiam gerar desregulação na inibição da atividade catalítica e portanto alteração na função dela. Este SNV junto com *rs2230728* são reportados em cânceres hematológicos e associados a progressão a leucêmica aguda, especialmente em indivíduos > 45 anos<sup>20</sup>; podendo tornar-se em marcadores genéticos de progressão leucêmica nas NMP.

Coexistência de variantes de *JAK2* não é um dado altamente descrito nas NMP; contudo isto poderia ter maiores repercussões na clínica dos indivíduos. Assim, neste estudo encontrou-se concomitância em até 3 variantes, em presença de *JAK2V617F*, apresentando perfis laboratoriais com leves incrementos nas linhas celulares, o que supõe que *JAK2V617F* confere de fato instabilidade genômica e poderia incrementar a sinalização intracelular e facilitar a aquisição de outras variantes dentro do mesmo gene. Lanikova et al.,<sup>37</sup> demonstraram mediante Sequenciamento de Sanger, a presença do SNV *rs2230723* em coexistência com *JAK2V617F*, descrevendo no caso contagens hematológicas normalizadas após administração de hidroxiuréia e que segundos experimentos funcionais, ambas variantes apresentaram sinalização aumentada em STAT1, STAT3 e STAT5, o que sugere o potencial de ambas variantes na predisposição maligna. Igualmente, outras variantes em *JAK2* poderiam conferir sinalização constitutiva fraca da via JAK/STAT, conferindo um fenótipo mieloproliferativo “mais atenuado”, apresentando contagens celulares com alteração discreta. No entanto, precisam-se de mais estudos que avaliem o comportamento funcional destas variantes, tanto individual como conjuntamente.

Embora nosso estudo destaque a importância da detecção de outras variantes na extensão completa da região codificante, e a coexistência de variantes no mesmo gene com possíveis repercussões no quadro clínico-laboratorial de indivíduos com NMP; ele apresenta várias limitações. Entre as principais limitações deste estudo citamos: amostral pequeno, falta de estudos funcionais que confirmem a atividade mieloproliferativa destas variantes e falta de associação alélica das variantes com desfechos, dado que poderia explicar possíveis predisposições malignas para o desenvolvimento de NMP.

Em conclusão, indivíduos com NMP *BCR/ABL1* negativo com a presença de variantes *rs2230724*, *rs2230722* e *rs77375493* tanto separada como conjuntamente evidenciam alterações discretas no perfil clínico-laboratorial, especialmente em concomitância com a variante *rs77375493*, demonstrando que sua função poderia estar diretamente envolvida na instabilidade de mecanismos regulatórios a nível proteico e possivelmente no fenótipo mieloproliferativo dos indivíduos com NMP.

## **Materiais e Métodos**

**Pacientes.** Foram incluídos 75 pacientes com diagnóstico de PV (n=29), TE (n=44) e MF (n=2), atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM) desde julho 2021 até Fevereiro 2022. Os participantes apresentaram ausência de transcritos *BCR/ABL1*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Nacional (Número de processo # 4.450.813). Todos os procedimentos foram realizados segunda resolução 466/12 do Ministério de Saúde do Brasil e Declaração de Helsinki. Todos os participantes providenciaram consentimento informado antes de participar do estudo.

**Dados clínicos e laboratoriais.** Dados clínicos foram obtidos de prontuários médicos incluindo: sexo, idade, esplenomegalia, histórico de eventos cardiovasculares, trombóticos ou hemorrágicos e tratamento administrado. Dados laboratoriais foram obtidos de coletas sanguíneas, incluindo: Contagem de eritrócitos (RBC), Hematócrito (Hto), hemoglobina (Hba), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Contagem de leucócitos (WBC), percentual de neutrófilos segmentados, monócitos e linfócitos; contagem plaquetária, Tempo de Protrombina-INR (PT-INR), Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT), Fibrinogênio (FIB), Lactato desidrogenase (DHL) e ácido úrico.

**Processamento de amostra sanguínea e extração de RNA.** RNA total foi extraído com TRIzol™ (*Ambion, USA*) de amostras de sangue periférico com anticoagulante EDTA, seguindo as instruções do fabricante. cDNA foi sintetizado utilizando SuperScript™ III Reverse Transcriptase (*Promega, USA*). Reação em cadeia da polimerase – Retrotranscriptase (RT-PCR) foi utilizada para obtenção de cDNA, utilizando os seguintes parâmetros de ciclagem: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e tempo indefinido a 4°C. Após reação, o cDNA foi armazenado a -80°C até realização de PCR convencional.

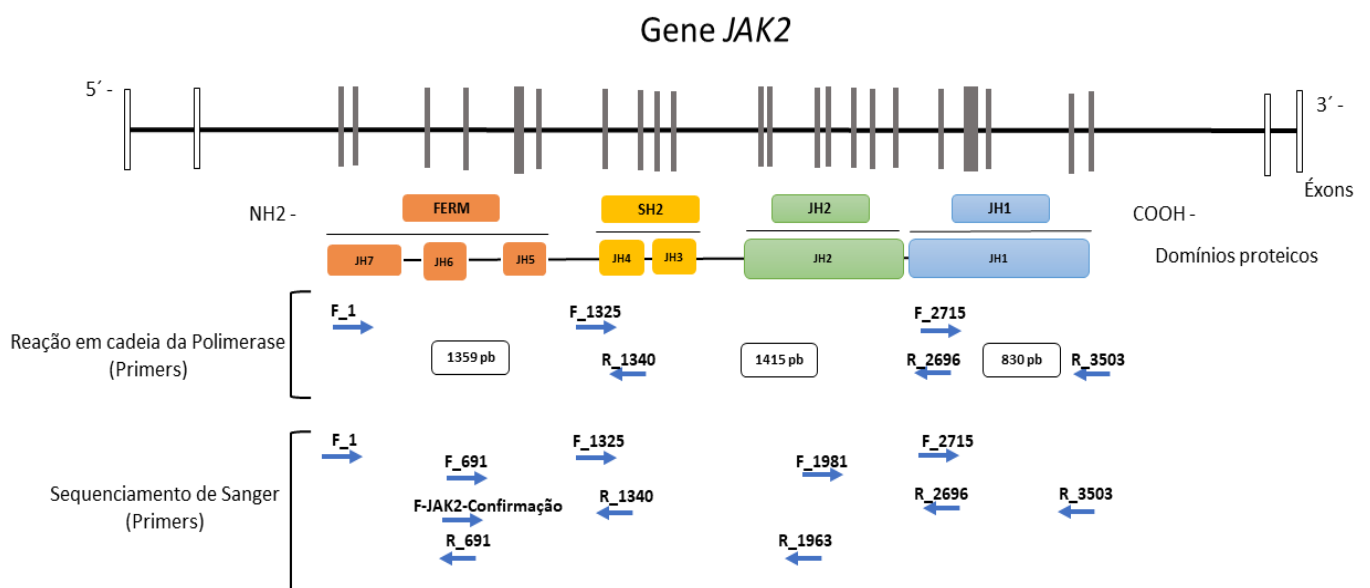
**PCR e análise por Sequenciamento de Sanger.** As amplificações foram realizadas utilizando um volume de 25 µL. Os produtos das reações foram visualizados mediante electroforese em gel de agarose ao 1,5% colorido com brometo de etídio. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o protocolo de purificação e precipitação de DNA por Polietilenglicol 8000 (*Promega*)<sup>25,26,27</sup>. Reação de sequenciamento de Sanger (em ambas direções) foi realizado usando *BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems)*, segundas recomendações do fabricante. Os primers utilizados no sequenciamento são descritos no quadro 2. Os primers utilizados também foram desenhados mediante a ferramenta Primer-BLAST- NCBI e OligoAnalyzer Tool-IDTDNA.com, avaliando a porcentagem de GC, Tm, capacidade de



*Hairpin*, e índice  $\Delta G$ , com a finalidade de flanquear a região codificante completa de JAK2, abrangendo desde o éxon 3 ao éxon 25 (Figura 1). Os produtos provenientes da reação de sequenciamento foram purificados mediante o protocolo de EDTA/Etanol, para ser posteriormente avaliados no sequenciador automático 3500 XL *Genetic Analyzer*® (*Applied BioSystems, USA*), utilizando polímero POP-7.

### Quadro 2. Primers utilizados no Sequenciamento de Sanger

Primers	Sequências 5'→3'	Temperatura de Anelamento
JAK2_F_1	GGC AAC AGG AAC AAG ATG TGA A	69°C
JAK2_Rev_691	AGC TGA TAG AGT TAT AGA TGG C	64°C
JAK2_F_691	AAA CGA TCA AAC CCC ACT GG	68°C
JAK2_Fow_1325	CCC AAT TTC GAT GGA TTT TGC CA	69°C
JAK2_Rev_1340	TCC AGT CTG ATT ACC TGC TT	65°C
JAK2_F_1981	ATT CTG GTT CAG GAG TTT G	62°C
JAK2_R_1963	CAA ACT CCT GAA CCA GAA T	62°C
JAK2_F_2715	GGT ATG ACCC CTC TAC AGG AC	66°C
JAK2_R_2696	GTC CTG TAG AGG GTC ATA CC	65°C
JAK_R1_3503	TTG GTC TCA GAA TGA AGG TC	64°C
F-JAK2-Confirmação	AGT GGT CCT TCA GGT GAG GAG	56°C



**Figura 1.** Estrutura do gene *JAK2*. As caixas cinzas correspondem aos éxons codificantes 3-25 que foram analisados por Sequenciamento de Sanger. Setas indicam primers usados nas reações. Caixas de texto pretas indicam o tamanho dos fragmentos.

**Análises de dados.** As sequências obtidas foram inicialmente analisadas mediante software *Sequencing Analysis (Applied biosystem [Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil])*; somente as sequências de boa qualidade foram usadas para análise de variantes. *Software Geneious 6.0.6 (Biomatters, USA)* foi usado para obter *contigs* e compará-los com a sequência de referência *Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2)*, transcrito 2, mRNA (NCBI: NM\_001322194.2). Amostras com presença de variantes raras foram sequenciadas e confirmadas duas vezes.

**Análise estatística.** Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%). Variáveis numéricas contínuas foram expressas por mediana e intervalo interquartil [IIQ]. Distribuição de variáveis numéricas contínuas foram conferidas mediante teste de Shapiro-Wilk. Análise estatística de variáveis categóricas foi realizada pelo teste Qui-Quadrado. Teste Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para análise de variáveis numéricas, quando for conveniente. Dados de indivíduos com MF foram excluídos da análise estatística entre grupos. Valores de  $p < 0.05$  consideraram-se estatisticamente significativos. Análise estatística dos dados realizou-se através do software *GraphPad Prism v8.2.1*.

## Referências

1. Barbui, T. *et al.* The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J.* **8**, 15. DOI: 10.1038/s41408-018-0054-y (2018).
2. Swerdlow S *et al.* WHO Clasification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4ta Ed. 2017.
3. Lussana, F. & Rambaldi, A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J. Autoimmun.* **85**, 58–63. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.06.010 (2017).
4. Challen, G. A. & Goodell, M. A. Clonal hematopoiesis: mechanisms driving dominance of stem cell clones. *Blood.* **136**, 1590–1598. DOI: 10.1182/blood.2020006510 (2020).
5. Bousoik, E. & Aliabadi, H. M. “Do We Know Jack” About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Front. Oncol* **8**, 1–20. DOI: 10.3389/fonc.2018.00287 (2018).
6. Palumbo, G. A. *et al.* The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. *Front. Oncol.* **9**. DOI: 10.3389/fonc.2019.00321 (2019).
7. Campbell, P. & Green, A.R. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*,

- 355**:2452-2466, DOI: 10.1056/NEJMra063728 (2006).
8. Tefferi, A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am. J. Hematol.* **91**, 50–58. DOI: 10.1002/ajh.24221 (2016).
  9. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365**, 1054–1061 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)74230-6 (2005).
  10. Chen, E. & Mullally, A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology*, **1**, 268–276 DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.268 (2014).
  11. Hubbard, S. R. Mechanistic insights into Regulation of JAK2 Tyrosine Kinase. *Front Endocrinol*, **8**, 361, 1–7 DOI: 10.3389/fendo.2017.00361 (2018).
  12. Geay, A. *et al.* Diagnosis of exon 12-positive polycythemia vera rescued by NGS. *Clin Case Rep*, **8**, 790–792. DOI: 10.1002/ccr3.2720 (2020).
  13. Bader, M. S. & Meyer, S. C. JAK2 in Myeloproliferative Neoplasms: Still a Protagonist. *Pharmaceuticals*, **15**,160, 1–13 DOI: 10.3390/ph15020160 (2022).
  14. Scott, L. M. *et al.* JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 459–468. DOI: 10.1056/NEJMoa065202 (2007).
  15. Villanueva, A. *et al.* A novel JAK2R564\* variant in a patient with thrombocytosis. *Int. J. Lab. Hematol.* **00**, 38–41. DOI: 10.1111/ijlh.13090 (2020).
  16. Alghasham, N., Alnouri, Y., Abalkhail, H. & Khalil, S. Detection of mutations in JAK2 exons 12-15 by Sanger sequencing. *Int. J. Lab. Hematol.* **38**, 34–41. DOI: doi:10.1111/ijlh.12425 (2016).
  17. Skov, V. Next Generation Sequencing in MPNs. Lessons from the Past and Prospects for Use as Predictors of Prognosis and Treatment Responses. *Cancers*, **12**, 2191, 1-38. DOI: 10.3390/cancers12082194 (2020).
  18. Loscocco, G. G., Guglielmelli, P. & Vannucchi, A. M. Impact of mutational profile on the management of myeloproliferative neoplasms: A short review of the emerging data. *Oncotargets. Ther.* **13**, 12367–12382. DOI: 10.2147/OTT.S287944 (2020).
  19. Sokol, J., Skerenova, M., Ivankova, J., Simurda, T. & Stasko, J. Association of Genetic Variability in Selected Genes in Patients With Deep Vein Thrombosis and Platelet Hyperaggregability. *Clin. Appl. Thromb.* **24**, 7, 1027–1032. DOI:

- 10.1177/1076029618779136 (2018).
20. Zhong, Y. *et al.* Association of Janus kinase 2 (JAK2) polymorphisms with acute leukemia susceptibility. *Int. J. Lab. Hematol.* **34**, 248–253. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2011.01386.x (2011).
  21. Yang, L. *et al.* Janus Kinase 2 Polymorphisms Are Associated with Risk in Patients with Gastric Cancer in a Chinese Population. *PLoS One* **8**, 1–7. DOI: 10.1371/journal.pone.0064628 (2013).
  22. Maslah, N. *et al.* Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls. *Ann. Hematol.* **98**, 111–118. DOI: 10.1007/s00277-018-3499-y (2018).
  23. De Carvalho, T. G. *et al.* Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **30**, 334–340. DOI: 10.3892/or.2013.2455 (2013).
  24. Chang, Y. C. *et al.* Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Med. Oncol.* **34**, 4–9. DOI: 10.1007/s12032-017-0944-z (2017).
  25. Silva, G. A. V. *et al.* Association of TNF -1031 C/C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. *Hum. Immunol.* **76**, 137–141. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.01.011 (2015).
  26. Lis, J. T. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol.* **65**, 347–353. DOI: 10.1016/s0076-6879(80)65044-7 (1980).
  27. Paithankar, K. R. & Prasad, K. S. N. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1346. DOI: 10.1093/nar/19.6.1346 (1991).
  28. Hasselbalch, H. C. Time for revival of the red blood cell count and red cell mass in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and polycythemia vera? *Haematologica* **104**, 2119–2125 DOI: 10.3324/haematol.2019.229039 (2019).
  29. Sunu, C. *et al.* The evaluation of patients with essential thrombocythemia in terms of risk of thrombosis. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **67**, 385–389. DOI: 10.1590/1806-9282.20200778 (2021).
  30. Buxhofer-Ausch, V. *et al.* Influence of platelet and white blood cell counts on major thrombosis – analysis from a patient registry in essential thrombocythemia.

- Eur. J. Haematol.* **97**, 511–516. DOI: 10.1111/ejh.12759 (2016).
31. Etheridge, S. L. *et al.* A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood* **123**, 1059–1068. DOI: 10.1182/blood-2012-12-473777 (2014).
  32. Kaifie, A. *et al.* Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. *J. Hematol. Oncol.* **9**, 18. DOI: 10.1186/s13045-016-0242-9 (2016).
  33. Milosevic Feenstra, J. D. *et al.* Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* **127**, 325–332. DOI: 10.1182/blood-2015-07-661835 (2016).
  34. Schulze, S. *et al.* Concomitant and noncanonical JAK2 and MPL mutations in JAK2V617F- and MPLW515 L-positive myelofibrosis. *Genes Chromosom. Cancer* **58**, 1–9. DOI: 10.1002/gcc.22781 (2019).
  35. Gou, P., Zhang, W. & Giraudier, S. Insights into the Potential Mechanisms of JAK2V617F Somatic Mutation Contributing Distinct Phenotypes in Myeloproliferative Neoplasms. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1013, 1-17. DOI: 10.3390/ijms23031013 (2022).
  36. Zhao, L., Ma, Y., Seemann, J. & Huang, L. J. S. A regulating role of the JAK2 FERM domain in hyperactivation of JAK2(V617F). *Biochem. J.* **426**, 91–98. DOI: 10.1042/BJ20090615 (2010).
  37. Lanikova, L. *et al.* Coexistence of gain-of-function JAK2 germline mutations with JAK2V617F in polycythemia vera. *Blood* **128**, 2266–2269 (2016).

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à equipe de apoio ao ensino do laboratório de Genômica (HEMOAM), laboratório de Genômica (CAM/UFAM) e ao Instituto Leônidas e Maria Deane Institute- ILMD-FIOCRUZ-AM. O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pro-Estado Program-#002/2008, #007/2018 and #005/2019, POSGRAD Program-#008/2021), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Conflito de Interesse**

Os autores declaram não possuir conflito de interesse.

### **Contribuição dos autores**

A.M.T. concibiu e supervisionou o estudo; D.G.T., G.V.S., L.P.S.M. e A.M.T. participaram na conceptualização, revisão da literatura, redação do manuscrito e padronização da metodologia experimental. A.G.C., G.V.S., A.M. e A.M.T. realizaram a análise formal de dados; A.M.T., A.G.C. e G.V.S. analisaram todos os dados; A.M.T., A.G.C., N.F. e G.V.S. revisaram e editaram o manuscrito. Todos os autores revisaram o manuscrito.

## 5. CONCLUSÕES

Das variantes identificadas na região codificante do gene *JAK2* em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativo, a maioria delas caracterizam-se como sinônimas e do tipo somático.

Os quatro domínios da proteína JAK2 (FERM, SH2, Pseudoquinase e Quinase) assim como também regiões de ligação entre domínios (FERM-SH2, SH2-JH2, JH2-JH1) apresentaram variantes na sequência nucleotídica.

As variantes *rs2230724*, *rs2230722* e *rs773754* foram as mais frequentes em indivíduos com policitemia vera e trombocitemia essencial, encontradas de forma exclusiva e conjuntamente.

Indivíduos com as variantes *rs2230724*, *rs2230722* e *rs77375493* evidenciam alterações discretas no perfil clínico-laboratorial, especialmente em concomitância com a variante *rs77375493*, demonstrando que indivíduos com PV com a combinação de variantes *rs2230722/rs77375493/rs2230724* (em concomitância) apresentam hematócrito e volume corpuscular médio aumentado e maior número de eventos cardiovasculares, contrario de indivíduos com TE que evidenciam aumento de Contagem global de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina e maior frequência de eventos trombohemorrágicos.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Barbui, T. *et al.* The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J.* 2018; 8, 15.
2. Lussana, F., Rambaldi, A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J. Autoimmun.* 2017; 85, 58–63.
3. Challen, G. A., Goodell, M. A. Clonal hematopoiesis : mechanisms driving dominance of stem cell clones. *Blood.* 2020: 136, 1590–1598.
4. Bousoik, E., Aliabadi, H. M. “ Do We Know Jack ” About JAK ? A Closer Look at JAK / STAT Signaling Pathway. *Front. Oncol.* 2018; 8: 287, 1–20.
5. Swerdlow S *et al.* WHO Clasification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4ta Ed. 2017.
6. Lorenzo, M., Grille, S., Stevenazzi, M. Emergence of BCR-ABL1 Chronic Myeloid Leukemia in a JAK2 -V617F Polycythemia Vera . *J. Hematol.* 2020: 9, 23–29.
7. Xiao, X. *et al.* Coexistence of *JAK2V617F* Mutation and *BCR-ABL1* Transcript in Two Chinese Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Acta Haematol.* 2012: 127, 47–49.
8. Palumbo, G. A. *et al.* The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. *Front. Oncol.* 2019: 9.
9. Schafer, A. I. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood.* 2006: 107, 4214–4222.
10. Jang, M. A., Choi, C. W. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean J. Intern. Med.* 2020: 35, 1–11.
11. de Freitas, R. M., da Costa Maranduba, C. M. Myeloproliferative neoplasms and the JAK/STAT signaling pathway: An overview. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2015: 37, 348–353.
12. Campbell P, Green A. The Mieloproliferative Disorders. *N Engl J Med.* 2006: 55, 2452-2466.
13. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005: 365, 1054–1061.
14. Chen, E., Mullally, A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology.* 2014: 268–276.
15. Hubbard, S. R. Mechanistic insights into Regulation of JAK2 Tyrosine Kinase. 2018: 8, 1–7.
16. Tefferi, A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am. J. Hematol.* 2016: 91, 50–58.
17. Zhan, H., Lin, C. H. S., Segal, Y., Kaushansky, K. JAK2V617F-Mutant Vascular Niche Promotes JAK2V617F Clonal Expansion in Myeloproliferative Neoplasms. *Blood .* 2016: 128, 952.



18. Lin, C. H. S., Zhang, Y., Kaushansky, K., Zhan, H. JAK2V617F-bearing vascular niche enhances malignant hematopoietic regeneration following radiation injury. *Haematologica*. 2018: 103, 1160–1168.
19. Geay, A. *et al.* Diagnosis of exon 12-positive polycythemia vera rescued by NGS. *Clin Case Rep*. 2020 ;8:790–792.
20. Bader, M. S., Meyer, S. C. JAK2 in Myeloproliferative Neoplasms : Still a Protagonist. *Pharmaceuticals*. 2022: 1–13.
21. Scott, L. M. *et al.* JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007: 356, 459–468.
22. Villanueva, A. *et al.* A novel JAK2 R564\* variant in a patient with thrombocytosis. *Int. J. Lab. Hematol.* 2020: 42, 38–41.
23. Alghasham, N., Alnouri, Y., Abalkhail, H., Khalil, S. Detection of mutations in JAK2 exons 12-15 by Sanger sequencing. *Int. J. Lab. Hematol.* 2016: 38, 34–41.
24. Maslah, N. *et al.* Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls. *Ann. Hematol.* 2019: 98, 111–118.
25. Skov, V. Next Generation Sequencing in MPNs. Lessons from the Past and Prospects for Use as Predictors of Prognosis and Treatment Responses. *Cancers*. 2020: 12, 2-38.
26. Sokol, J., Skerenova, M., Ivankova, J., Simurda, T., Stasko, J. Association of Genetic Variability in Selected Genes in Patients With Deep Vein Thrombosis and Platelet Hyperaggregability. *Clin. Appl. Thromb.* 2018: 24, 1027–1032.
27. Zhong, Y. *et al.* Association of Janus kinase 2 (JAK2) polymorphisms with acute leukemia susceptibility. *Int. J. Lab. Hematol.* 2012: 34, 248–253.
28. Yang, L. *et al.* Janus Kinase 2 Polymorphisms Are Associated with Risk in Patients with Gastric Cancer in a Chinese Population. *PLoS One*. 2013: 8, 1–7.
29. De Carvalho, T. G. *et al.* Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2013: 30, 334–340.
30. Chang, Y. C. *et al.* Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Med. Oncol.* 2017: 34, 4–9.
31. Hermouet, S., Bigot-Corbel, E., Gardie, B. Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2015: 1-16.
32. Martínez, L. F., Santana, H. G., Díaz Alonso, C. A. Biomarkers in classical myeloproliferative neoplasms BCR-ABL1 negative. *Rev. Cuba. Hematol. Inmunol. y Hemoter.* 2019: 35, 1–14.
33. Nonino A. Perfil Clínico e Genômico de Pacientes com Mielofibrose. Universidade Católica de Brasília. 2019: 1-35.
34. Amorim C. Doenças Mieloproliferativas. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Brasil.
35. Heller, P. G. Biología molecular de las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas : 10 años después del JAK2. *Hematología*. 2015: 19, 40–44.

36. Pastore, F., Schneider, S., Christ, O., Hiddemann, W., Spiekermann, K. Impressive thrombocytosis evolving in a patient with a BCR-ABL positive CML in major molecular response during dasatinib treatment unmasks an additional JAK2V617F. *Exp. Hematol. Oncol.* 2013; 2, 1.
37. Martin-Cabrera, P., Haferlach, C., Kern, W., Schnittger, S., Haferlach, T. BCR-ABL1-positive and JAK2 V617F-positive clones in 23 patients with both aberrations reveal biologic and clinical importance. *Br. J. Haematol.* 2017; 176, 135–139.
38. Ciesla B. Hematology in practice. Davis Company. 2007, 16-17.
39. Lang, T. *et al.* Correlation analysis between JAK2 , MPL , and CALR mutations in patients with myeloproliferative neoplasms of Chinese Uygur and Han nationality and their clinical characteristics. *J. Int. Med. Res.* 2018; 46, 4650–4659.
40. Ojeda, M. J. *et al.* CALR, JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients with BCR-ABL1- negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology.* 2018; 23, 208–211.
41. França PL. Caracterização clínica e molecular de pacientes com neoplasia mieloproliferativa crônica – cromossomo Ph- negativo. Universidad Federal de Pernambuco. Recife. 2016.
42. Gastaldon J, Rauber L, Baribieri T. Perfil dos pacientes com neoplasia mieloproliferativa cromossomo philadelfia negativo na unidade de alta complexidade oncológica do Hospital São José em Criciúma/SC no período de 2008 a 2015. *Arquivos Catarinenses de Medicina.* 2018; 47 (2), 2-12.
43. Machado-Neto, J. A. *et al.* Somatic mutations of calreticulin in a Brazilian cohort of patients with myeloproliferative neoplasms. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2015; 37, 211–214.
44. Carbonell, A. L. I., Salhab, R. M., Giampaoli, V., Cendoroglo, M. S., Chauffaille, M. de L. A model for the functional assessment of elderly with myeloid neoplasms. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2015; 37, 109–114.
45. Callera, F. *et al.* Oncohematological diseases in the Vale do Paraíba, state of São Paulo: Demographic aspects, prevalences and incidences. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2011; 33, 120–125.
46. Rodak B, Carr J. Clinical Hematology Atlas. ELSEVIER. 5ta Ed. USA. 2017: 11-12.
47. Hofmann, I. Myeloproliferative neoplasms in children. *J. Hematop.* 2015; 8, 143–157.
48. Kaifie, A. *et al.* Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. *J. Hematol. Oncol.* 2016; 9, 18.
49. Matsuura, S. *et al.* Platelet dysfunction and thrombosis in JAK2V617F-mutated primary myelofibrotic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020; 262–272.
50. Hu, L. *et al.* Relationship between JAK2V617F mutation, allele burden and coagulation function in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology.* 2017; 22, 354–360.
51. Conran, N., de Paula, E. V. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease - challenging the hemostatic balance. *Haematologica.* 2020; 105, 2380–2390.
52. Hoffbrand V, Catovsky D, Tuddenham E, Green A. Postgraduate Haematology. 6ta. Ed.

Wiley-Blackwell. 2011.

53. Macedo, L. C. *et al.* Association of TNF polymorphisms with JAK2 (V617F) myeloproliferative neoplasms in Brazilian patients. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2016: 57, 54–57.
54. Da Silva, R. R. D. *et al.* JAK2 V617F mutation prevalence in myeloproliferative neoplasms in Pernambuco, Brazil. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2012: 16, 802–805.
55. Langabeer, S. E. *et al.* Molecular heterogeneity of familial myeloproliferative neoplasms revealed by analysis of the commonly acquired JAK2, CALR and MPL mutations. *Fam. Cancer* . 2014: 13, 659–663.
56. Jones, A. V., Cross, N. C. P. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther. Adv. Hematol.* 2013: 4, 237–253.
57. Sieza, Y. *et al.* Distribución de mutaciones en JAK2, MPL y CALR en pacientes con sospecha de neoplasias mieloproliferativas crónicas Phi negativas provenientes de hospitales públicos de la provincia de Buenos Aires. *Hematología* 2018: 22, 151–156.
58. Heller, P., Lev, P. Estudio molecular en Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas: mutación JAK2V617F. *Hematología.* 2013: 176–178.
59. Nangalia, J., Green, A. R. Myeloproliferative neoplasms: From origins to outcomes. *Hematology* . 2017, 470–479.
60. Prins, D., González Arias, C., Klampfl, T., Grinfeld, J., Green, A. R. Mutant Calreticulin in the Myeloproliferative Neoplasms. *HemaSphere* . 2020:4, 333.
61. Ghai, S., Rai, S. Megakaryocytic morphology in Janus kinase 2 V617F positive myeloproliferative neoplasm. *South Asian J. Cancer* . 2017: 06, 075–078.
62. Faruqi, U., Breen, K. A. Is There a Role for Direct Oral Anticoagulants in the Primary and Secondary Prevention of Myeloproliferative Neoplasm Associated Thrombosis? *Hemato* . 2021: 2, 769–780.
63. Schieber, M., Crispino, J. D., Stein, B. Myelofibrosis in 2019: moving beyond JAK2 inhibition. *Blood Cancer J.* 2019: 9, 74.
64. Vannucchi, A. M., Guglielmelli, P. What are the current treatment approaches for patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia? *Hematology.* 2017, 480–488.
65. Berzoti-Coelho, M. G. *et al.* The expression of Death Inducer-Obliterator (DIDO) variants in Myeloproliferative Neoplasms. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2016: 59, 25–30.
66. Tefferi, A. *et al.* Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: analysis based on 1002 informative patients. *Leukemia* . 2018: 32, 1189–1199.
67. Goette, N. P. *et al.* Monocyte IL-2R $\alpha$  expression is associated with thrombosis and the JAK2V617F mutation in myeloproliferative neoplasms. *Cytokine.* 2010: 51, 67–72.
68. Hernández-Flórez, D., Valor, L. Los inhibidores de las proteínas-cinasas en enfermedades autoinmunes e inflamatorias: Presente y futuro de nuevas dianas terapéuticas. *Reumatol. Clin.* 2016: 12, 91–99.
69. Morris, R., Kershaw, N. J., Babon, J. J. The molecular details of cytokine signaling via

- the JAK / STAT pathway. *Hematology Am. Soc.* 2018; 27, 1984–2009.
70. Vainchenker, W., Kralovics, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. 2017; 129, 667–679.
  71. Meyer S, Levine R. Molecular Pathways: Molecular Basis for Sensitivity and Resistance to JAK Kinase Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2015; 20: 2051–2059.
  72. Levine, R. L., Wernig, G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* . 2006: 233–239.
  73. Habel, J. *et al.* Inflammation-driven activation of JAK / STAT signaling reversibly accelerates acute myeloid leukemia in vitro. *Blood adv.* 2020: 4.
  74. Torres, D. G. *et al.* JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Biomolecules.* 2022: 12.
  75. Liu, Q. *et al.* JAK2 expression is correlated with the molecular and clinical features of breast cancer as a favorable prognostic factor. *Int. Immunopharmacol.* 2021: 90, 107186.
  76. Gou, P., Zhang, W., Giraudier, S. Insights into the Potential Mechanisms of JAK2V617F Somatic Mutation Contributing Distinct Phenotypes in Myeloproliferative Neoplasms. *Int. J. Mol. Sci.*. 2022: 23.
  77. Zhao, L., Ma, Y., Seemann, J., Huang, L. J. S. A regulating role of the JAK2 FERM domain in hyperactivation of JAK2(V617F). *Biochem. J.* 2010: 426, 91–98.
  78. Ungureanu, D *et al.* The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol.* 2016: 18 (9), 971–976.
  79. Constantinescu, S. N., Vainchenker, W., Levy, G., Papadopoulos, N. Functional Consequences of Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. *HemaSphere:* 2021: 5, 6.
  80. Gangat, N., Tefferi, A. JAK2 mutations in myeloproliferative neoplasms. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 2011: 13, 612–617.
  81. M. Perner F., Perner C., Ernst T., Heidel F. H. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells.* 2019: 8 (854), 1-19.
  82. Castiglione, M. *et al.* Endothelial JAK2V617F mutation leads to thrombosis, vasculopathy, and cardiomyopathy in a murine model of myeloproliferative neoplasm. *J. Thromb. Haemost.* 2020: 18, 3359–3370.
  83. Mckerrell, T. *et al.* JAK2 V617F hematopoietic clones are present several years prior to MPN diagnosis and follow different expansion kinetics. *Blood adv.* 2017: 1, 1–3.
  84. Darling, H. S., Kumar, R., Kapoor, R., Singh, J., Verma, T. BCR-ABL and JAK2V617F Mutation Co-existence, Rare or Just Unexplored. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2017: 33, 633–635.
  85. Albano F., Fava C., Vanucci A. Concomitant occurrence of BCR-ABL and JAK2V617F mutation. *Blood.* 2011: 118 (12), 3445–3446.
  86. Kambas, K. *et al.* Fast and reliable mutation detection of the complete exon 11-15 JAK2 coding region using non-isotopic RNase cleavage assay (NIRCA). *Eur. J. Haematol.*

- 2009: 83, 215–219.
87. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet (London, England)*. 2005: 365, 1054–61.
  88. Levine, R. L. *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7. 2005: 387–397.
  89. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005: 434, 1144–1148.
  90. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* . 2016: 127, 2391–2405.
  91. Kralovics, R., Stockton, D. W., Prchal, J. T. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. *Blood* . 2003: 102, 3793–3796.
  92. Nussbaum, R.; McInnes, R.; Willard, H. Thompson & Thompson Genética Médica. Ed 8. 2018.
  93. Ranjan, A., Penninga, E., Jelsig, A. M., Hasselbalch, H. C., Bjerrum, O. W. Inheritance of the chronic myeloproliferative neoplasms. A systematic review. *Clin. Genet.* 2013: 83, 99–107.
  94. Kralovics, R., Stockton, D. W., Prchal, J. T. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. *Blood* . 2003: 102, 3793–3796.
  95. Higgs, J. R. *et al.* Familial essential thrombocythemia with spontaneous megakaryocyte colony formation and acquired JAK2 mutations. *Leukemia*. 2008: 22, 1551–1556.
  96. Dezern, A. E., Gondek, L. P. Stem cell donors should be screened for CHIP. *Blood adv.* 2020: 4, 0–4.
  97. Castiglione, M., Zhan, H. Cell Competition and Microenvironment in the Development of Myeloproliferative Neoplasms. *Blood* . 2019: 134, 2485.
  98. Norfo, R. Clonal Selection of Mutant HSC in MPN: What do I know? *Blood*. 2021.
  99. Jackson, L. A. *et al.* An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* 2020: 383, 1920–1931.
  100. Gleitz, H *et al.* Increased CXCL4 expression in hematopoietic cells links inflammation and progression of bone marrow fibrosis in MPN. *Blood*. 2020: 136, 2051–2064.
  101. Koschmieder, S. *et al.* Myeloproliferative neoplasms and inflammation: Whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both. *Leukemia*. 2016: 30, 1018–1024.
  102. Gaertner, F., Massberg, S. Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity. *Semin. Immunol.* 2016: 28, 561–569.
  103. Edelmann, B. *et al.* JAK2-V617F promotes venous thrombosis through  $\beta 1/\beta 2$  integrin activation. *J. Clin. Invest.* 2018: 128, 4359–4371.

104. Ferrer-Marín, F., Cuenca-Zamora, E. J., Guijarro-Carrillo, P. J., Teruel-Montoya, R. Emerging role of neutrophils in the thrombosis of chronic myeloproliferative neoplasms. *Int. J. Mol. Sci.* 2021: 22, 1–14.
105. Gupta, N. *et al.* JAK2-V617F activates  $\beta$ 1-integrin-mediated adhesion of granulocytes to vascular cell adhesion molecule 1. *Leukemia.* 2017: 31, 1223–1226.
106. Luque Paz, D. *et al.* Leukemic evolution of polycythemia vera and essential thrombocythemia: genomic profiles predict time to transformation. *Blood Adv.* 2020: 4, 4887–4897.
107. Gao, T. *et al.* Interplay between chromosomal alterations and gene mutations shapes the evolutionary trajectory of clonal hematopoiesis. *Nat. Commun.* 2021: 12, 1–11.
108. Kjær, L. Clonal hematopoiesis and mutations of myeloproliferative neoplasms. *Cancers (Basel).* 2020: 12, 1–21.
109. Vassiliou, G. S. JAK2 V617F clonal disorders: Fate or chance? *Blood.* 2016: 128, 1032–1033.
110. Morris, R., Butler, L., Perkins, A., Kershaw, N. J., Babon, J. J. The role of Ink (Sh2b3) in the regulation of jak-stat signalling in haematopoiesis. *Pharmaceuticals* 2022: 15.
111. Pietra, D. *et al.* Brief report Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F) -negative myeloproliferative disorders. *Blood.* 2008: 111, 3–5.
112. Park, C. *et al.* High frequency of JAK2 exon 12 mutations in Korean patients with polycythaemia vera: novel mutations and clinical significance. *Clin Pathol.* 2016: 737–741.
113. Scott, L. M. The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. *Am. J. Hematol.* 2011: 86, 668–676.
114. Passamonti, F. *et al.* Brief report Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. 2011: 117, 2813–2816.
115. Ginzburg, Y. Z. *et al.* Dysregulated iron metabolism in polycythemia vera : etiology and consequences. *Leukemia.* 2018: 2105–2116 (2018).
116. Grisouard, J. *et al.* JAK2 exon 12 mutant mice display isolated erythrocytosis and changes in iron metabolism favoring increased erythropoiesis. *Blood.* 2016: 128, 839–851.
117. Bellosillo, D. B. Universitat Autònoma de Barcelona Facultat de Medicina. Bellaterra. 2015.
118. Schnittger, S. *et al.* Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2 V617F negative. *Haematologica.* 2009: 94, 414-418.
119. Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G., Albano, F. The JAK2 GGCC (46/1) Haplotype in Myeloproliferative Neoplasms : Causal or Random ?. *Int. J. Mol. Sci.* 2018: 1–12.
120. Hasan, S. *et al.* Use of the 46/1 haplotype to model JAK2 V617F clonal architecture in PV patients: Clonal evolution and impact of IFN treatment. *Leukemia.* 2014: 28, 460–463.

121. Bahar, B., Barton, K., Kini, A. R. The role of the Exon 13 G571S JAK2 mutation in myeloproliferative neoplasms. *Leuk. Res. Reports* . 2016: 6, 27–28.
122. Prager, M. *et al.* The JAK2 variant rs10758669 in Crohn’s disease: Altering the intestinal barrier as one mechanism of action. *Int. J. Colorectal Dis.* 2012: 27, 565–573.
123. Silva, G. A. V. *et al.* Association of TNF -1031 C/C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. *Hum. Immunol.* 2015: 76, 137–141.
124. Lis, J. T. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol.* 1980: 65, 347–353.
125. Paithankar, K. R., Prasad, K. S. N. Precipitation of DNA by polyethyleneglycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* 1991: 19, 1346.

## 7. ANEXOS

### 7.1. ARTIGO DE COLABORAÇÃO SUBMETIDO NA REVISTA *BLOOD RESEARCH*

(ISSN 2288-0011)

Fator de Impacto: 0.86

#### **Detection of JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative neoplasms in a Brazilian population**

#### **JAK2V617F mutation in MPN**

Wanessa H. Laranjeira<sup>1</sup>, **Dania G. Torres**<sup>1,2</sup>, Nadja Garcia<sup>1</sup>, Allyson G. da Costa<sup>1,2,4</sup>, Adriana Malheiro<sup>1,2,3</sup>, Lucivana P. de Souza Mourão<sup>2,7</sup>, George V. Silva<sup>2,5,6</sup> and Andréa M. Tarragô<sup>1,2,3</sup>. \* (ORCID: 0000-0003-3125-580X)

<sup>1</sup> Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil.

<sup>4</sup> Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

<sup>5</sup> Fundação Oswaldo Cruz–Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz), Manaus, AM 69027-070, Brazil;

<sup>6</sup> Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), Manaus, AM 69040-010, Brazil;



<sup>7</sup> Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil.

**\*Correspondence:** Andrea M. Tarragô, PhD, Laboratório de Genômica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Av. Constantino Nery, 4397 - Chapada, Manaus - AM, Zip code 69050-001, Phone: +55-92-991360001, E-mail: [andrea\\_s\\_monteiro@hotmail.com](mailto:andrea_s_monteiro@hotmail.com)

## ABSTRACT

**Background:** Chronic Myeloproliferative Neoplasms (MPN) are a group of diseases, characterized by the hyperplasia of progenitor hematopoietic cells in the bone marrow and increased circulation of mature cells in the peripheral blood. This study aims to investigate the occurrence the JAK2V617F mutation in patients with myeloproliferative neoplasms in the state of Amazonas-Brazil. **Methods:** Molecular analysis of JAK2V617F was performed by Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase-Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR) and Sanger Sequencing. The accuracy, sensibility, and specificity of the test was calculated by online application OpenEpi. **Results:** 103 samples were analyzed by RFLP-PCR methodology, 91 (88.3%) were negative, 12 (11.6%) were positive. 8 patients (7.8%) carried GT genotype (heterozygote) and 2 (1.9%) carried TT genotype (mutant homozygote). The performance of the RFLP-PCR assay and Sanger Sequencing for the detection of the JAK2V617F mutation showed equivalent results, with a level of diagnostic accuracy of 98.06%, sensitivity of 100% and specificity of 97.85%. **Conclusions:** Both techniques can be used to detect JAK2V617F. RFLP-PCR can be used as a screening technique in laboratories where routine laboratory conditions are limited; and Sanger sequencing can be used in the diagnostic confirmation of JAK2V617F positive cases.

**Keywords:** Chronic myeloproliferative neoplasms, RFLP-PCR, clonal hematopoiesis, Sanger Sequencing.

## INTRODUCTION

Chronic Myeloproliferative Neoplasms (MPN) are diseases of a clonal nature, characterized by the aberrant proliferation of hematopoietic cells in the bone marrow [1, 2]. In its most recent edition of the Classification System for Hematopoietic and Lymphoid Tissue Tumors, published in 2016, the World Health Organization (WHO) revised the diagnostic criteria for the category of myeloproliferative neoplasms, which after the update now include seven clinical entities: chronic myeloid leukemia (CML), chronic neutrophilic leukemia (CNL), polycythemia vera (PV), myelofibrosis (MF), essential thrombocythemia (ET), chronic eosinophilic leukemia (CLE) and unclassifiable myeloproliferative neoplasm (U-MPN) [3, 4].

The molecular characteristics, clinical and laboratory data and hematological findings support the diagnosis of MPNs: polycythemia vera phenotype is typically represented by erythrocytosis, while essential thrombocythemia is marked by expansion of the megakaryocytic lineage; and myelofibrosis, due to medullary fibrosis and abnormalities in granulocytes and megakaryocytes on bone marrow stroma [4–6]. The three clinical entities also share manifestations such as hepatosplenomegaly, leukocytosis, thrombocytosis, microvascular symptoms, thrombohemorrhagic complications, risk of leukemic transformation or fibrotic progression [6–11]. Patients with *JAK2V617F* positive myeloproliferative neoplasms are generally older and have higher leukocyte and hemoglobin counts and reduced platelet counts compared to patients with *JAK2* mutation of exon 12 [5, 12, 13]. It is further reported that patients with the *JAK2V617F* mutation have a higher rate of associated complications compared to wild-type *JAK2* patients [6, 14].

While CML has its etiology linked to the *BCR/ABL1* proto-oncogene, the pathological mechanism of PV, TE and MF, in turn, is triggered by mutations in the and Janus kinase 2 gene (*JAK2*) thrombopoietin receptor (*MPL*) and calreticulin (*CALR*) [1, 17, 18]. The *JAK2V617F* mutation stands out for being the most frequent molecular alteration in *BCR/ABL1* negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms, being reported in approximately 95% of patients with PV and in about 50-60% in patients with ET and PMF [6, 12, 16].

Located on chromosome 9p24, the *JAK2* gene encodes the JAK2 protein, a cytoplasmic tyrosine kinase associated with hematopoietic cytokine receptors (EPO, TPO, IL-3 and GM-CSF) that acts directly on intracellular signal transduction, triggering the activation of factors involved in cellular processes such as proliferation, differentiation and apoptosis [6, 17, 18]. The *JAK2V617F* mutation occurs in exon 14 of the *JAK2* gene, specifically in the pseudo-kinase regulatory domain where it replaces a guanine (G) base with a thymine (T), which in turn results in the change of amino acid valine (V) for phenylalanine (F) at nucleotide 1849 of codon 617 of the polypeptide chain of the *JAK2* gene. Such alteration constitutively stimulates the catalytic activity of JAK2, and consequently alters the intracellular signaling pathways of molecules of the STAT families and via MAPK/ERK-PI3K/AKT [6, 10, 14, 19]

In Brazil, there are currently scientific research concerning the molecular and epidemiological study of *BCR/ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms [17, 20–22]. However, the literature does not allude to research focused on the area in the state of Amazonas. Thus, the present study is focused on the investigation and molecular characterization of the *JAK2V617F* mutation in patients with myeloproliferative neoplasms in the region. The research aims to generate new genetic data, contributing directly to the management and treatment of these hematological malignancies. With this, the accomplishment

of this research will contribute to the acquisition of diagnostic/prognostic tools in favor of the target population.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design**

A total of 103 patients with chronic myeloproliferative neoplasms were included in the research according to the ICD (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) provided in the patients' medical records (PV: ICD-10 D45, ET: ICD-10 D47. 3, CML: ICD-10 C92.1, MDS: ICD-10 D46) in accordance with the guidelines established by the World Health Organization (WHO), attended at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) in the period from January to 2017 to December 2020. Subsequently, insufficient samples for analysis were excluded from the study, as well as patients who did not present sufficient data in their medical records for clinical and laboratory characterization of the disease.

### **Ethical Statement**

Ethics approval for the study was obtained from the Brazilian National Ethics Committee (approval number #4.943.653). All procedures are in accordance with the Resolution 466/12 from the Brazilian Ministry of Health and with the Helsinki Declaration. The participants read and signed the informed consent form before enrollment.

### **Genomic DNA extraction**

Briefly, genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using a TRIzol™ (ThermoFisher Scientific) protocol [23, 24] according to the manufacturer's recommendations. After extraction, all samples were stored at -80 °C until the *JAK2V617F* genotyping analyses.

### **Molecular analysis of JAK2V617F**

Sample analysis was performed by Restriction Fragment Length Polymorphism- Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR). Initially, *JAK2V617F* was amplified with the primers *JAK2V617F* 5' – GGGTTTCCTCAGAACGTTGA – 3' forward and *JAK2V617F* 5' – TCATTGCTTTCCTTTTTCACAA – 3' reverse [1, 17]. PCR amplifications occurred containing 100-200 ng of genomic DNA, 0.2 mM DNTP; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 pmol of each primer, 1X PCR buffer and 1U Taq DNA polymerase [17, 20]. The fragments were amplified using the following cycling parameters: 96°C for 2 minutes followed by 45 cycles at 96°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute. The PCR product obtained is 460 bp and was separated on a 2% agarose gel to confirm the amplification. The resulting product was subjected to digestion with 2 units of the endonuclease Bsa XI (New England BioLabs inc.), for 16 h at 37°C, in then analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel. Wild-type *JAK2V617F* alleles show two visible bands with 241bp and 189bp and a minor band with 30bp, while *JAK2V617F*-positive samples show a single predominant band at 460bp, remain uncleaved in the presence of the 1849 T allele.

### **Nucleotide sequencing**

Sanger sequencing was performed on the same amplicons as used for RFLP analysis. The amplified fragments were purified using Polyethylene Glycol (PEG 8000, Promega). The purified products were directly sequenced on both strands using the PCR primers and the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems/Perkin-Elmer, Foster City, CA) in an automated sequencer (ABI 3500, Applied Biosystems) using POP7 polymer. The sequences were initially analyzed by the Sequencing Analysis software (Applied Biosystems, v5.3.1). Only sequences with a Phred score cutoff of  $\geq 20$  were considered, correspond to a 99% accuracy in the base call. The contigs sequences were obtained and aligned

to a reference sequence NG\_009904.1 (NCBI: 3717) using the Geneious 6.2 software (Biomatters™, USA).

### **Data analysis**

Demographic, clinical and laboratory data were presented in tables and graphs, prepared using the Excel program (Microsoft Corporation). Categorical variables are expressed as absolute value (n) and relative frequency (%). Accuracy test was calculated by an online application (<https://www.openepi.com/DiagnosticTest/DiagnosticTest.htm>) and Stata software, version 16.0 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA). Sensitivity was calculated as the proportion of participants carrying the *JAK2V617F* mutation who were positive by Sanger Sequencing and specificity as the number of *JAK2V617F* negative participants by Sanger Sequencing. Positive predictive value (PPV) was calculated as the proportion of participants among those with a Sanger-positive result and negative predictive value (NPV) as the proportion of participants without the *JAK2V617F* mutation among Sanger-positive patients. The 95% confidence intervals (CI) of these proportions were calculated. The above indicators were calculated for the general population and according to the *JAK2V617F* mutation status in the analyzed samples.

### **RESULTS**

103 samples of patients were analyzed, both sexes (men 53.4%; women 46.6%) aged between 02 and 88 years old (49.7 years  $\pm$  19.6) Table 1. 91 (88.3%) of that samples were negative by the RFLP-PCR methodology.

**Table 1.** Clinical and laboratory characteristics of the patients included in the study (n=103).\*: *Unclassified diagnosis*

	<i>PV</i>	<i>CML</i>	<i>MDS</i>	<i>ET</i>	<i>Others*</i>
Age ( $\pm$ SD)	71,4 ( $\pm$ 11,4)	47,6 ( $\pm$ 19,17)	67 ( $\pm$ 8,6)	50 ( $\pm$ 18,03)	48,2 ( $\pm$ 21,42)
Gender (M/F)	2/3	36/31	2/1	2/6	13/7
Hemoglobin (g/L) (range)	15,9 ( $\pm$ 3,34)	10,07 ( $\pm$ 2,30)	8 ( $\pm$ 1,59)	10,8 ( $\pm$ 1,67)	10,1 ( $\pm$ 2,5)
JAK2 <sup>WT</sup>	0/5	67/67	1/3	7/8	20/20
JAK2V617F <sup>+</sup>	5/5	4/67	2/3	1/8	0/20

The JAK2V617F mutation was detected in 12 (11.6%) of the 103 samples analyzed, distributed among the clinical entities: Polycythemia Vera (5), Chronic Myeloid Leukemia (4), Myelodysplastic Syndrome (2) and Essential Thrombocythemia (1) Table 2. The mean age observed in patients positive for the JAK2V617F mutation was 68.5 years ( $\pm$  9.6).

**Table 2.** Comparison of *JAK2V617F* mutation detection in positive samples from individuals with MPN. \*: *Unclassified diagnosis*.

Diseases	n	Positivity for <i>JAK2V617F</i>	
		RFLP-PCR (n=103)	Sanger Sequencing (n=103)
Polycythemia Vera, n (%)	5	5 (100%)	5 (100%)
Chronic myeloid leukemia, n (%)	67	4 (5%)	2 (3%)
Myelodysplastic Syndrom, n (%)	3	2 (66,6%)	2 (66,6%)
Essential Thrombocithemia, n (%)	8	1 (12,5%)	1 (12,5%)
Others*	20	0	0

In order to validate the RFLP-PCR technique for the *JAK2V617F* target, it was decided to carry out a new test of the samples using the Sanger Sequencing method. 8 samples (7.8%) had the GT genotype (heterozygote) and 2 (1.9%) had the TT genotype (mutant homozygote), while 2 samples were negative by this technique. Thus, only 10 of the 12 samples were confirmed as positive for the *JAK2V617F* mutation by both techniques, as described in Table 3.

**Table 3.** Comparative diagnostic performance between Sanger Sequencing and RFLP-PCR for the *JAK2V617F* mutation. A diagnostic Test was used to evaluate the described indicators, calculated according to the *JAK2V617F* mutation status in the analyzed samples.

Abbreviations: PPV: Positive Predictive Value; NPV: Negative Predictive Value, CI:

Confidence Interval.



	Sanger Sequencing	RFLP-PCR
Overall	103 (100%)	
JAK2V617F-positive	10 (18,7%)	12 (11.6%)
JAK2V617F-negative	93 (82.3%)	91 (88.3%)
Accuracy % (IC 95%)	98.06 (93.19-99.47)	98.06 (93.19-99.47)
Sensitivity % (IC 95%)	100.0 (72.25- 100.0)	100.0 (72.25- 100.0)
Specificity % (IC 95%)	97.85 (92.49-99.41)	97.85 (92.49-99.41)
PPV* % (IC 95%)	83.33 (55.2-95.3)	83.33 (55.2-95.3)
NPV % (IC 95%)	100.0 (95.95-100)	100.0 (95.95-100)
Weighted Kappa % (IC 95%)	0.89 (0.70-1.09)	0.89 (0.70-1.09)

## DISCUSSION

Among the MPN patients included in the study, there was a high frequency of CML, followed by TE and PV; as well as an equivalence between genders, with a slight male predominance, in agreement with data related to the world statistics of MPN [4, 16, 25]. In addition, the presence of *JAK2V617F* was detected in 1 case of CML positive for the b3a2 transcript (unpublished data); a finding also demonstrated by recent investigations that describe the coexistence of *JAK2V617F* and *BCR/ABL1* in individuals with CML or MPN; suggesting that despite being a rare event, it could constitute a new hematological entity [12], [26], [27].

On the other hand, this investigation also aimed to search for diagnostic/prognostic tools that can be implemented in secondary and tertiary health centers in the state of Amazonas, which would directly contribute to the monitoring and treatment of these hematological diseases in the region. Thus, the diagnostic techniques evaluated were RFLP-PCR and Sanger sequencing, techniques widely used in the diagnosis of MPN [1], [22], [28], [29].

RFLP-PCR is a low-cost method, with good reproducibility and suitable for routine conditions; however, it is a laborious technique that demands the use of high concentrations of genetic material and whose results must be interpreted with great caution, since it is an assay that eventually presents incomplete digestion in the action of the digestion enzyme, causing false-positives results and possible misdiagnoses [22, 28]. Sanger sequencing is a robust, reproducible, fast technique that demands low concentrations of genetic material. However, it is an expensive test, which requires qualified personnel for its interpretation and specialized equipment, which, however, provides results of greater diagnostic accuracy [22, 30].

The performance of the RFLP-PCR assay and Sanger Sequencing for the detection of the *JAK2V617F* mutation showed equivalent results, indicating a level of diagnostic accuracy between both techniques of 98.06%, sensitivity of 100% and specificity of 97.85%. Similar data

were obtained in the comparative study by Didone et al., in which RFLP-PCR and Sanger Sequencing, presented a similar performance to each other, with levels of accuracy, sensitivity and specificity of 97.8, 94.0 and 100%, respectively [22].

Therefore, the results indicate that the RFLP-PCR technique may be suitable to be implemented in the laboratory routine of secondary health centers; being used as a screening technique in individuals with clinical suspicion of MPN. Given the risk of false-positives for the *JAK2V617F* mutation occurring due to interference in the RFLP-PCR technique, we suggest the adoption of a screening protocol in which positive samples can be forwarded to reference centers for secondary diagnostic confirmation through Sanger sequencing technique. Molecular tests, together with assessments of the symptoms presented by the patient, data from the blood count and complementary tests, such as histological examination of the bone marrow, are especially essential to establish a safe and well-founded diagnosis in the criteria established by the WHO, which contributes to adjustment of patient therapy and generates new data to update the real epidemiological distribution of myeloproliferative neoplasms in Brazil.

Although our study generates benefits for the diagnostic improvement of MPN in the Amazon region; some limitations are considered, among them, we highlight: the present investigation aims to screen the *JAK2V617F* variant in individuals with MPN without allelic discrimination, the screening was performed in a low number of individuals with classic MPN and confirmation by it was performed only by sanger sequencing [1, 2, 18, 22, 28].

In conclusion, the evaluation of genetic factors as *JAK2V617F* opens new perspectives in patients management at Fundação HEMOAM. RFLP-PCR and Sanger sequencing techniques can be used to detect *JAK2V617F*. RFLP-PCR can be used as a screening technique in laboratories where routine laboratory conditions are limited; and Sanger sequencing can be used in the diagnostic confirmation of RFLP-PCR positive *JAK2V617F* cases.

### **Conflict of interest**

The authors have declared that no competing interests exist.

### **Acknowledgments**

The study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program - #002/2008, #007/2018 and #005/2019; POSGRAD 2021 Program #008/2021). The funding agencies were not involved in this publication.

### **Authors' contributions**

A.M.T. conceived and supervised the study; W.H.L., D.G.T., L.P.S.M. and A.M.T. provided the conceptualization, literature review, manuscript writing and standardization of experimental methodology. A.G.C., G.V.S., A.M. and A.M.T. conducted the formal analysis; A.M.T., A.G.C. and G.V.S. analyzed all the data; N.G., A.M.T., A.G.C. and G.V.S. reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final version.

### **REFERENCES**

- [1] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365 (9464):054–1061.
- [2] Tefferi A and Vannucchi AM. Genetic Risk Assessment in Myeloproliferative Neoplasms, *Mayo Clin. Proc* 2017; 92 (8):1287-1290.
- [3] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia, *Blood* 2016;127(20): 2391-2405.
- [4] Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion, *Blood Cancer J* 2018; 8(2):15
- [5] Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis: An International Study. *J. Clin. Oncol* 2011; 29(23):3179–3184.
- [6] Vainchenker W and Kralovics R Genetic basis and molecular pathophysiology of

- classical myeloproliferative neoplasms, *Blood* 2017;129(6):667-679.
- [7] Landtblom AR, Bower H, Andersson TML, et al. Second malignancies in patients with myeloproliferative neoplasms: a population-based cohort study of 9379 patients, *Leukemia* 2018; 32(10):2203-2210.
- [8] Zhan H, Lin CHS, Segal Y and Kaushansky K. The JAK2V617F-bearing vascular niche promotes clonal expansion in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2018 32:462-469.
- [9] Perner F, Perner C, Ernst T, Heidel FH. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells* 2019; 8(8) 854.
- [10] Matsuura S, Thompson CR, Belghasem ME, et al. Platelet dysfunction and thrombosis in JAK2V617F-mutated primary myelofibrotic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc* 2020; 40:262–272.
- [11] Chen E and Mullally A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology* 2014; 204(1).
- [12] Lang T, Nie Y, Wang Z et al. Correlation analysis between JAK2, MPL, and CALR mutations in patients with myeloproliferative neoplasms of Chinese Uyghur and Han nationality and their clinical characteristics,” *J. Int. Med. Res* 2018; 46(11):4650–4659
- [13] Jang MA and Choi CW. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean J. Intern. Med* 2020;35(1):1–11.
- [14] Greenfield, G., McMullin, MF, and Mills K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms, *J. Hematol. Oncol* 2021; 14:103.
- [15] Bousoik, E and Montazeri Aliabadi, H. “Do We Know Jack” About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway, *Front. Oncol* 2018; 8:287.
- [16] Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Podoltsev NA and Zeidan AM. Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map, *Blood Rev* 2020; 42 (6):100706
- [17] Monte-Mór BCR, da Cunha AF, Pagnano BBK, Saad ST, Lorand-Metze I, and Costa FF. JAK2V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Genet. Mol. Biol* 2007; 30(2):336-338.
- [18] Saeidi K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics, *Critic Rev Onc/Hemat* 2016 98(2):375–389.
- [19] A Krämer A, Reiter A, Kruth J, et al. JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia, *Lancet Oncol* 2007; 8 (7):658–660.
- [20] Pagliarini-e-Silva S, Santos BC, Pereira EMF, et al. Evaluation of the association

between the JAK2 46/1 haplotype and chronic myeloproliferative neoplasms in a Brazilian population. *Clinics* 2013; 68(1):5–9.

- [21] Macedo LC, Santos BC, Pagliarini-e-Silva S, et al. JAK2 46/1 haplotype is associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms in Brazilian patients. *Int. J. Lab. Hematol* 2015; 37(5):654-660.
- [22] Didone A, Nardinelli LM, Ruiz M, et al. Comparative study of different methodologies to detect the JAK2 V617F mutation in chronic BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. *Pract. Lab. Med* 2016; 4:30–37.
- [23] Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1993; 15:532-537
- [24] Hummon, AB, Lim SR, Elppantonoj MJ, and Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* 2007; 42:467-472
- [25] Tefferi, A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol* 2021; 96(1):145–162.
- [26] Kantarcioglu B, Kaygusuz-Atagunduz I, Uzay A, Toptas T, Tuglular TF, and Bayik M. Myelodysplastic syndrome with t(9;22)(p24;q11.2), a BCR-JAK2 fusion: case report and review of the literature. *Int. J. Hematol* 2015;102(3) 383–387.
- [27] Darling HS, Kumar R, Kapoor R, Singh J, and Verma T. BCR-ABL and JAK2V617F Mutation Co-existence, Rare or Just Unexplored? *Indian J. Hematol. Blood Transfus* 2017; 33(4):633–635.
- [28] Bakker E. Is the DNA sequence the gold standard in genetic testing? Quality of molecular genetic tests assessed. *Clin. Chem* 2006; 52(4):557–558.
- [29] Frantz C, Sekora DM, Henley DC, et al. Comparative evaluation of three JAK2V617F mutation detection methods. *Am. J. Clin. Pathol* 2007; 128(5):865–874.
- [30] Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, et al. Targeted Next-Generation Sequencing can Replace Sanger Sequencing in Clinical Diagnostics. *Hum. Mutat* 2013; 34(7):1035–1042.

## 7.2. PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA E PESQUISA (CEP)

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

**Pesquisador:** ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 39991420.6.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.450.813

#### Apresentação do Projeto:

As Neoplasias Mieloproliferativas crônicas são doenças clonais causadas pela proliferação aberrante de células hematopoiéticas na medula óssea. Caracterizam-se por rearranjos genéticos cujos produtos atuam nas principais vias de transdução de sinais celulares (JAK/STAT, a via PI3K-AKT e proteínas da via MAPK) que conduzem a uma superprodução simples ou multilinear dos elementos eritróides, mielóides e megacariocíticos. Entre as neoplasias mieloproliferativas crônicas mais frequentes destacam: Leucemia Mielóide Crônica (BCR-ABL1 +), Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária; estas últimas classificadas como BCR-ABL.

As neoplasias mieloproliferativas crônicas representam um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula progenitora hematopoiética, sendo caracterizadas por proliferação elevada, mas com diferenciação e maturação relativamente preservadas.

Nos últimos anos, diversos estudos permitiram a descoberta das bases moleculares dessas doenças, que têm, em comum, a ativação constitutiva da tirosinoquinase decorrente de mutações adquiridas pela célula-tronco hematopoiética.

Sabe-se que a detecção de mutações nos genes JAK2, MPL e CARL e o conhecimento de fatores genético individuais podem contribuir para uma melhor avaliação prognóstica dos pacientes com NMC que, apesar de diagnóstico definido respondem de forma diferente durante o curso do tratamento. Assim, ao conhecer o background genético dos pacientes espera-se traçar um perfil

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4097, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (Jule 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoram.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Protocolo: 4.450.813

clínico baseadas nas variantes encontradas nesta população a fim de que biomarcadores moleculares sejam utilizados para ajudar a controlar o avanço da doença.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Caracterizar molecularmente pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mieloide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária (MP).

**Objetivo Secundário:**

- Rastrear a translocação BCR-ABL1 p210 mediante análise de transcritos b2a2 e b3a2;
- Determinar a frequência de mutações nos genes JAK2 (JAK2V617F, éxon 12), CALR (mutações éxon 9) e MPL (mutações éxon 10);
- Avaliar a presença simultânea da mutação BCR-ABL1 e JAK2V617F;
- Identificar o haplótipo do gene JAK2 (pesquisa do alelo G pelo SNP rs10974944);
- Avaliar a associação da presença do alelo G com a mutação V617F do gene JAK2;
- Associar as mutações nos genes JAK2, MPL e CALR com características clínicas e laboratoriais.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos da pesquisa caracterizam-se por perda de amostras, de informações dos pacientes e quebra de sigilo. A fim de evitá-los, as amostras serão identificadas e armazenadas corretamente tomando-se viáveis para estudos futuros. Os dados pessoais dos participantes da pesquisa serão armazenados em planilha do software Microsoft Excel, acessível somente aos pesquisadores do estudo em estado de sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

**Benefícios:**

Os benefícios da participação nesta investigação estão direcionados ao estudo molecular das neoplasias Mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas na população Amazonense, à compreensão de novos achados genéticos que geram grande impacto no manejo e tratamento destas malignidades hematológicas. Com isso, a realização desta pesquisa contribuirá à aquisição de ferramentas diagnósticas/prognósticas a favor da população alvo.

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4367, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Cidade:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemcam.am.gov.br



FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto bem delineado, metodologia coerente com objetivos e cronograma.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- 1)Folha de rosto anexada à PB;
- 2)Cartas de anuência anexadas à PB;
- 3)Termo de Consentimento Livre e Esclarecido anexado à PB;
- 4)Instrumento da Pesquisa junto com o projeto anexado à PB;
- 5)Riscos: Anexados à PB;
- 6)Benefícios: Anexados à PB;
- 7)TCUD anexado à PB;
- 8) Currículo lattes do pesquisador responsável anexado à PB.
- 9) Cronograma: Adequado.

**Recomendações:**

Vide conclusões ou pendências.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto é importante para caracterizar molecularmente pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mieloide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária , sendo viável do ponto de vista ético e de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1658907.pdf	04/12/2020 18:48:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Anuência	TCLEfinal.pdf	04/12/2020 18:48:00	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Outros	AndreaTarrago.pdf	02/12/2020 18:05:17	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto.pdf	09/11/2020 18:49:52	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (Júlia 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoram.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.013

MANAUS, 09 de Dezembro de 2020

---

Assinado por:  
**SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-000  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemocam.am.gov.br



### **7.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) Conforme Resolução N° 466/12 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE**

O presente documento visa convidá-lo para participar no projeto de pesquisa que tem por título: **“Caracterização molecular de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas”**, sendo a pesquisadora responsável: Dra. Andréa M. Tarragô e colaboradores. Assim, o estudo tem como objetivo caracterizar as alterações genéticas que estão presentes em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mielóide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária (MP).

**JUSTIFICATIVA:** Mediante da sua participação nesta pesquisa, a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia de Amazonas- HEMOAM permitirá oferecer ferramentas no diagnóstico/prognóstico em pacientes que sejam atendidos na Fundação com doenças no sangue chamadas neoplasias mieloproliferativas crônicas. Assim como compreender novos conhecimentos que provocam grande impacto no acompanhamento do tratamento destas doenças. No Estado de Amazonas não existem pesquisas sobre estudo molecular de Neoplasias Mieloproliferativas crônicas, que identifiquem alterações em genes denominados *JAK2*, *MPL* e *CALR*, importantes no desenvolvimento de doenças no sangue (neoplasias mieloproliferativas crônicas). O estudo proposto abrange seres humanos; portanto envolve certos riscos/desconfortos e benefícios, os quais são apresentados a seguir:

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Sua participação nesta pesquisa não está associada a nenhum tipo de risco, os únicos desconfortos estão associados ao processo de coleta do sangue, manifestando uma possível aparição de hematoma, sangramento no sítio de punção, ardor causado pelo álcool, lesão de nervo (raramente), náuseas, vômitos ou desmaios. Ressalta-se que a equipe de coleta de amostras é altamente qualificada, os quais possuem manuais e treinamentos para identificar e tratar reações que possam surgir durante ou após extração do sangue.

**BENEFÍCIOS:** Os benefícios indiretos da sua participação nesta investigação estão direcionados ao estudo molecular (material genético) de doenças no sangue chamadas neoplasias Mieloproliferativas crônicas na população Amazonense e à aquisição de novos

conhecimentos que provocam grande impacto no monitoramento e tratamento destas doenças. Com isso, a realização desta pesquisa contribuirá à aplicação de ferramentas diagnósticas/prognósticas a favor da população em estudo; não originando nenhum tipo de benefício direto ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes desta pesquisa.

Em caso de você aceitar participar do estudo, serão realizados os seguintes procedimentos:

**PROCEDIMENTO DE COLETA DO SANGUE/ ANÁLISE LABORATORIAL:** Será extraída uma amostra de sangue, limpando o sítio de punção com algodão e álcool, empregando agulhas e tubos plásticos novos e estéreis. As amostras do sangue serão coletadas em quatro tubos (um com tampa azul, um com tampa amarela e dois com tampa roxa), utilizando um volume de sangue acorde às indicações do fabricante. Ao finalizar a punção, a amostra se armazenará em condições ótimas até sua análise laboratorial.

**REVISAO DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS:** Serão revisados os seus prontuários médicos tanto nos arquivos físicos como nos arquivos digitais (arquivos armazenados no sistema do HEMOAM) para obtenção de dados clínicos como Sexo, Idade, diagnóstico (CID= Código estabelecido para uma determinada doença) resposta ao tratamento e quadro clínico manifestado.

**ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL:** Se você sofrer algum dano ou intercorrência, deverá falar para alguém da equipe da pesquisa imediatamente ou em caso de emergência, poderá contatar diretamente Dra. Andréa Monteiro Tarragô, pesquisadora responsável pelo estudo, através do telefone (92) 99136-0001 ou por e-mail [andrea\\_s\\_monteiro@hotmail.com](mailto:andrea_s_monteiro@hotmail.com). Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar e do seu acompanhante. A equipe da pesquisa irá garantir que você receba assistência imediata para reparação a dano (caso tenha quaisquer tipos de danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios), sofridos no decorrer de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento.

Após conhecer os procedimentos que serão realizados para desenvolver o estudo, você deverá saber o seguinte:

**VOLUNTARIEDADE:** Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você tem o direito a recusar-se a participar ou retirar-se do estudo em qualquer momento, sem que esta decisão afete a qualidade de atendimento médico (ou de outra índole) no HEMOAM. Cabe mencionar, que você não perderá nenhum direito legal por assinar este documento.

**CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO:** Os seus dados pessoais referentes à participação neste estudo permanecerão confidenciais durante o desenvolvimento da pesquisa toda, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade. Assim mesmo, os dados obtidos de testes realizados poderão ser utilizados de forma anônima para publicações científicas ou ser apresentados em uma reunião científica. Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); e-mail: cephemoam@gmail.com; endereço: na Av. Constantino Nery, 4397-Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13 (CEP-HEMOAM), Chapada, Manaus - AM; telefone: (92) 3655-0114. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

**USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO:** O material biológico coletado (sangue) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e solicitamos a sua autorização para armazenamento de material para estudos futuros. Garantimos que toda nova pesquisa a ser realizada utilizando as amostras armazenadas será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da FHEMOAM e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Desta forma, o Sr. (a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras relacionadas com o estudo de alterações genéticas que desenvolvem doenças no sangue? ( )  
Sim ou ( ) Não

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

\_\_\_\_\_

(Assinatura do participante)

\_\_\_\_\_

(Assinatura do pesquisador)



(Impressão dactiloscópica)

Manaus, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## 7.4. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA EXTRAÇÃO DE RNA COM REAGENTE TRIZOL

Preparar com antecipação centrífugas a 4°C e banho maria a 60°C.

### 7.4.1. Fase de lise (Células em suspensão)

- 1- Centrifugar as amostras descongeladas por 5 minutos a 3500 rpm a 4°C.
- 2- Retirar o *buffy coat* (1 mL) em um tubo previamente identificado. Descarte o restante de material. Em caso de sobrar plasma, identifique um novo tubo e armazene a -80°C.
- 3- Acrescente 1 mL de tampão de lise de hemácias no tubo com o *buffy coat*.
- 4- Agite no vórtex até observar lise.
- 5- Centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm a 4°C.
- 6- Após centrifugação, observar pellet e verificar se é necessário lisar 1 vez mais. Senão for o caso, omitir lise e continuar o procedimento.
- 7- Acrescentar 1 mL de Trizol e agite no vórtex por 10 segundos. Se não for possível continuar o procedimento; deixar congelada a amostra com Trizol a -80°C.
- 8- Adicione 200 uL de clorofórmio e agite no vórtex por 10 minutos.
- 9- Centrifugue os tubos a 13200 rpm. por 15 min a 4°C. Após centrifugação, a mescla do material estará separado em 3 fases, aquosa, interfase e fase orgânica.
- 10- Transferir 500 uL da fase aquosa (que contém RNA) a um tubo novo previamente rotulado. Retire com cuidado para não contaminar com DNA.

### 7.4.2. Fase de extração e precipitação de RNA

- 11- Adicione 500 uL de isopropanol absoluto no tubo que foi transferida a fase aquosa. Homogeneizar por inversão e deixar descansar por 10 min a temperatura ambiente.
- 12- Centrifugar a 13200 rpm por 15 min a 4°C. O RNA total precipitará em forma de um botão no fundo do tubo.
- 13- Descartar o sobrenadante com cuidado, vertendo o microtubo em papel absorvente para retirar o excesso de isopropanol.
- 14- Ressuspenda o botão em 1 mL de etanol 75 % gelado e agite por 10 seg. no vórtex.
- 15- Centrifugar a 12000 rpm. por 7 min a 4°C.

- 16- Descarte o sobrenadante com cuidado, vertendo o microtubo em papel absorvente para retirar o excesso de álcool.
- 17- Repetir os passos 14, 15 e 16. Assegure-se de que no lavado final o tubo esteja o máximo possível livre de etanol.
- 18- Ressuspenda o botão em 20 uL de água ultrapura gelada.
- 19- Solubilizar o botão no vórtex.
- 20- No banho maria, incube o material ressuspendido por 10 minutos a 60°C.
- 21- Após incubação, quantificar o material extraído observando as relações 260/280 e  $260/230 < 1.6-2.0$
- 22- Separe uma alíquota de 5 uL para avaliação da qualidade do RNA em gel de 0,8%
- 23- Armazene o resto de material extraído a -80°C.

#### **7.4.3. Preparação do gel a 0,8% para avaliação de integridade de RNA**

- 1- Diluir o TBE 10X em TBE 1X;
- 2- Com uma proveta separar 50 mL de TBE 1X; em caso de trabalhar na cuba menor. Se for na maior separar 200 mL.
- 3- Pesar 0,4 g Agarose; se for na cuba menor. Na maior pesar 0,8 g.
- 4- Dissolver a Agarose em 50 mL de TBE 1X em um Erlen-mayer de 250mL;
- 5- Aquecer a Solução em micro-ondas até a solubilização completa da Agarose;
- 6- Quando a solução com agarose estiver fria, adicionar 1,0-2,0 µL de Brometo e 20 uL de Formaldeído na solução e homogeneizar;
- 7- Despejar a solução na cuba e colocar cuidadosamente os pentes;
- 8- Esperar solidificar. Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel.
- 9- Colocar **5,0** µL de Blue Juice em uma placa de Terasaki; e acrescentar **5,0** uL da alíquota de extração previamente separada.
- 10- Homogeneizar e Aplicar os **10** µL do conteúdo por cada poço;
- 11- Ajustar a fonte (Volts = 100) e deixar o gel em corrida por 25 minutos.
- 12- Revelar a imagem no Transiluminador e salvar a imagem na pasta apropriada.

## 7.5. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA SÍNTESE DE cDNA

### Mix para síntese de cDNA Kit Promega

Reagentes	1 Reação Vol (µL)
H <sub>2</sub> O	7,18
Buffer 5X	4,0
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,7
PCR nuclease mix	1,0
RNasin	0,12
RT Ez	1,0
Volume do Mix por tubo	15
RNA	2,5/5
Oligo dT	1,0
H <sub>2</sub> O	1,5/-
Volume final por amostra	20

<b>Incubar 5 minutos a 70° C</b>
<b>Incubar 5 minutos em gelo</b>
<b>Acrescentar Mix</b>

CICLAGEM PARA SÍNTESE DE cDNA		
Temperatura	Tempo	Ciclos
25°C	5 minutos	1
42°C	60 minutos	1
4°C	∞	-

## 7.6. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE



<b>Mix para Reação PCR – CDS JAK2 (F2715-R1_3505\ F1-R1340)</b>			
<b>Reagentes</b>	<b>[ ] Reação</b>	<b>1 Reação Vol (µL)</b>	<b>Mix ___5___Reações Vol (µL)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	13,55	67,75
<b>Buffer 10X PCR</b>	1X	2,5	12,5
<b>dNTPs [2 mM]</b>	0,2 mM	2,5	12,5
<b>MgCl<sub>2</sub> [50 mM]</b>	2,5 mM	1,25	6,25
<b>Primer <i>JAK2-F</i></b>	0,2 pmol	1	5
<b>Primer <i>JAK2-R</i></b>	0,2 pmol	1	5
<b>Taq DNA</b>	1 U	0,2	1,0
<b>Amostra cDNA</b>	> 30 ng/ul	3,0	3,0
<b>Volume Final da Reação</b>	25 uL	25	25
<b>Volume por Mix</b>	22 uL	22	22

<b>Mix para Reação PCR – CDS JAK2 (F1325 - R2696)</b>			
<b>Reagentes</b>	<b>[ ] Reação</b>	<b>1 Reação Vol (µL)</b>	<b>Mix ___5___Reações Vol (µL)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	14,05	70,25
<b>Buffer 10X PCR</b>	1X	2,5	12,5
<b>dNTPs [2 mM]</b>	0,2 mM	2,5	12,5
<b>MgCl<sub>2</sub> [50 mM]</b>	1,5 mM	0,75	3,75
<b>Primer <i>JAK2-F</i></b>	0,2 pmol	1	5
<b>Primer <i>JAK2-R</i></b>	0,2 pmol	1	5
<b>Taq DNA</b>	1 U	0,2	1,0
<b>Amostra cDNA</b>	> 30 ng/ul	3,0	3,0
<b>Volume Final da Reação</b>	25 uL	25	25
<b>Volume de Mix por tubo</b>	22	22	22

- Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo:

<b>CICLAGEM PARA PCR- CDS JAK2 (F2715-R1_3503)</b>			
Temperatura	Fase	Tempo	Ciclos
94°C	Desnaturação inicial	5 minutos	1
94°C	Desnaturação	30 segundos	35
59°C	Anelamento	30 segundos	
72°C	Extensão	1 minuto	
72°C	Extensão final	7 minutos	1
4°C	∞	-	-

<b>CICLAGEM PARA PCR- CDS JAK2 (F1-R1340 \ F1325- R2696)</b>			
Temperatura	Fase	Tempo	Ciclos
94°C	Desnaturação inicial	5 minutos	1
94°C	Desnaturação	30 segundos	35
63°C	Anelamento	30 segundos	
72°C	Extensão	1 minuto, 45 segundos	
72°C	Extensão final	7 minutos	1
4°C	∞	-	-

- Após amplificação, correr as amostras em gel de Agarose ao 1,5 %.

## 7.7. PROCEDIMENTO USADO PARA SEQUENCIAMENTO DE SANGER

- Armazenar *amplicons* a -80 C.

### 7.7.1. Precipitação de produto da PCR com Polietilenoglicol (PEG)

A precipitação com PEG atua como método de purificação da PCR com objetivo de remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento. Apresenta um bom rendimento, podendo utilizar somente 0,5-1 ul da amostra na reação de sequenciamento. O método não é recomendado para PCR com bandas inespecíficas ou como primer-dimers.

Antes de iniciar o procedimento:

- Armazene etanol 80% a -20 C. (utilizar etanol 80% ou preparar a partir de etanol absoluto  $C1V1=C2V2$ , sendo V1 meu X)
- Programe o banho-maria seco a 37° C.
- Prepare placas de sequenciamento ou tubos de máximo 1,5 mL.
- Em caso necessário, preparar o PEG 20% W\|V PEG 2,5 M NaCl)

Para sua preparação, usar:

10 g de PEG 8000

7,3 g de NaCl

Adicione 35 mL de ddH<sub>2</sub>O. Agite para solubilizar o PEG durante 20 min ou até solubilizar. Após agitação, completar o volume para 50 mL com ddH<sub>2</sub>O.

### Procedimento:

- 1- Transfira o volume do PEG no tubo de 1,5 mL ou na placa de sequenciamento. \*LEMBRE-SE: O volume de PEG a ser adicionado deve ser igual ao volume da PCR. Neste caso 20 uL + 20 uL.
- 2- Transfira o volume do *amplicon* no tubo de 1,5 mL ou na placa de sequenciamento.
- 3- Agite suavemente por 10 seg (em caso de ser tubo) e incube a 37° C por 15 min.
- 4- Após incubação, centrifugue a 2500 rcf (6000 rpm) por 15 min a temperatura ambiente em caso de ser tubo. Em caso de ser placa centrifugar entre 2200-2500 rcf por 25 min a temperatura ambiente.
- 5- Descarte o sobrenadante (por inversão da placa) e adicione 125 uL de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 rcf (4500 rpm) por 2 min a 4° C.
- 6- Descarte o sobrenadante, dei um spin com a placa invertida e deixe secando a 60°C por 10 min para remoção de resíduos de etanol. Deixe a placa sem adesivo. Em caso de tubos, a secagem pode ser a 37°C entre 20-50 min.
- 7- Certifique a ausência de resíduos de etanol e adicione H<sub>2</sub>O milli Q ou ultrapura, adicionando o mesmo volume inicial da PCR (20 uL). \*LEMBRE-SE: Amostras com banda fraca ou pouca quantidade de amostra devem ser ressuspensas em menor quantidade de H<sub>2</sub>O, 12 uL de água.

8- Homogenice e armazene a amostra a  $-80^{\circ}\text{C}$ . \*LEMBRE-SE: Antes de armazenar as amostras a  $-80^{\circ}\text{C}$ , armazene a  $4-5^{\circ}\text{C}$  por algumas horas para melhor eluição de DNA.

9- Quantificar as amostras pelo menos 3 dias após precipitação, passando do freezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) à geladeira  $4-5^{\circ}\text{C}$  pelo menos 2 H antes da quantificação.

### 8.6.2. Preparação do mastex mix para sequenciamento

1- Preparar o mapeamento de amostras, colocando as amostras por duplicata (metade da placa para leitura de Primer Forward e a outra metade para leitura do primer Reverse), sendo o nosso protocolo de trabalho o seguinte,

2- Aliquotar do Primer-Forward e do primer reverse utilizados na PCR. (Calcular a quantidade a utilizar segundo número de amostras).

3- Preparar o mix com os seguintes reagentes;

<b>MIX DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE SANGER</b>		
<b>Reagente</b>	<b>1 Reação Vol (1 uL)</b>	<b>22 Reações (Vol uL)</b>
H2O ultrapura	4,5/5,0/5,5	99
Tampão 5X	2,0	44
Primer [3.3 Mm]	1,0	22
BigDye	0,5	11
Produto amplificado	2,0/1,5/1,0	2
TOTAL por poço/tubo	10	10

Após mescla, levar para termociclador e preparar a seguinte programação de ciclagem:

Stage 1	96°C por 1 min	1 ciclo
Stage 2	96°C por 10 seg	15 ciclos
	55°C por 15 seg	
	60°C por 1 min, 15 seg	
	96°C por 10 seg	
	55°C por 15 seg	

Stage 3	60°C por 1 min, 30 seg	5 ciclos
	55°C por 15 seg	
	60°C por 1 min, 15 seg	
Stage 3	96°C por 10 seg	5 ciclos
	55°C por 15 seg	
	60°C por 1 min, 30 seg	
Stage 4	96°C por 10 seg	5 ciclos
	55°C por 15 seg	
	60°C por 2 min	
Stage 5	4°C, ∞	1 ciclo

### 8.6.3. Purificação do sequenciamento (Método EDTA/Etanol)

- 1- Após reação de sequenciamento, centrifugar a placa a 2000 rpm x 2 min a 4°C.
- 2- Em cada poço, adicionar:
  - 2,5 uL de EDTA (125 mM)
  - 25 uL de etanol 100% gelado
- 3- Realizar um spin e incubar a temperatura ambiente e protegido da luz por 15 min.
- 4- Centrifugar a 2000 rcf x 45 min a 4°C.
- 5- Inverter a placa na pia para descartar material não aderido na reação e centrifugar a placa invertida a 100 rcf x 1 min.
- 6- Adicionar 35 uL de etanol 70% (temperatura ambiente) em cada poço.
- 7- Centrifugar a 1650 rcf por 15 min a 4°C.
- 8- Inverter a placa na pia para descartar material não aderido na reação e centrifugar a placa invertida a 100 rcf x 1 min.
- 9- Secar a placa no termociclador a 60°C x 10 min (OBSERVAÇÃO: Colocar a placa sem tampa).
- 10- Armazenar a -20°C as placas até realizar leitura no sequenciador. As placas podem ficar até 1 mês. Em caso de ler no mesmo dia não congelar.

#### **8.6.4. Preparação de amostras pré-leitura no sequenciador**

Prepare o termociclador ou termobloco a 95°C.

1-Nas amostras que foram armazenadas a -20°C, adicione 10 uL de Formamida em cada poço.

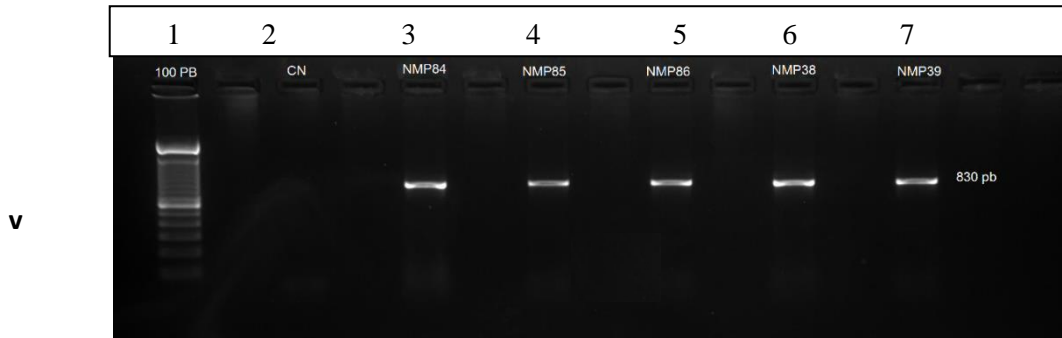
2- Realizar um breve spin na placa.

3- Aquecer a placa no termociclador a 95°C por 1 minuto.

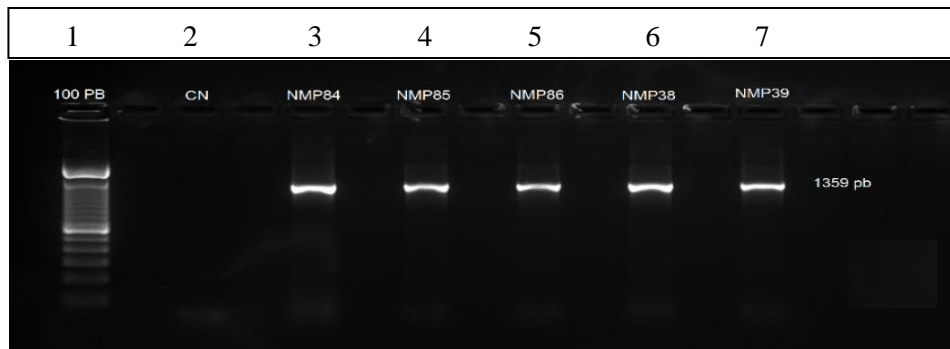
4- Ler no sequenciador. (Em caso de não ser lidas nesse momento congelar a -20°C)

- LEMBRE-SE de manter sempre a placa protegida da luz.

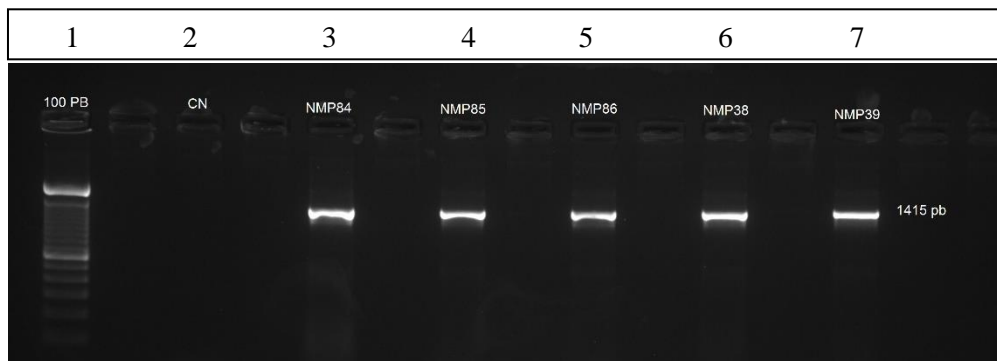
## 7.8. PRODUTOS OBTIDOS DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE



**Figura 9.7.1.** Amplificação do extremo 3' da região codificante do gene *JAK2*, determinada pelo fragmento de 830 pb. Linha 1: Ladder 100 pb; Linha 2: Branco; Linhas 3-7: amostras de pacientes incluídos no estudo.

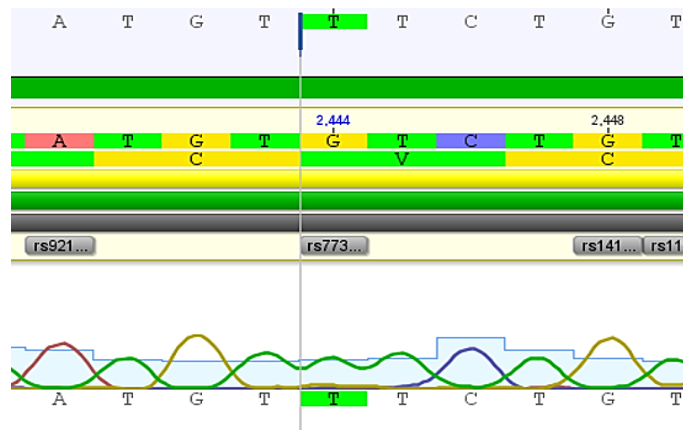


**Figura 9.7.2.** Amplificação do extremo 5' da região codificante do gene *JAK2*, determinada pelo fragmento de 1359 pb. Linha 1: Ladder 100 pb; Linha 2: Branco; Linhas 3-7: amostras de pacientes incluídos no estudo.

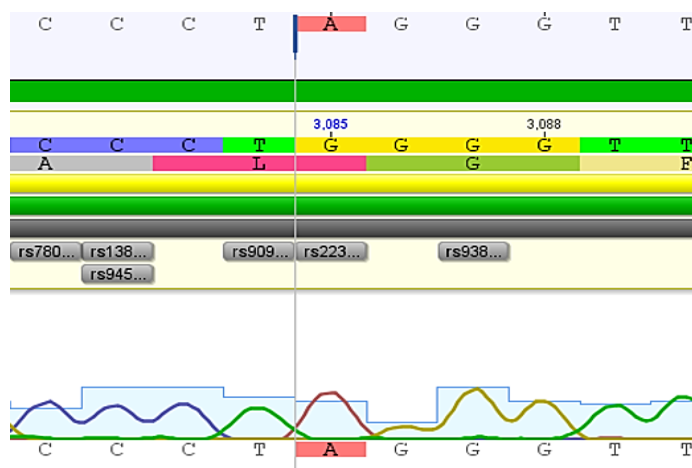


**Figura 9.7.3.** Amplificação da zona intermédia da região codificante do gene *JAK2*, determinada pelo fragmento de 1415 pb. Linha 1: Ladder 100 pb; Linha 2: Branco; Linhas 3-7: amostras de pacientes incluídos no estudo.

## 7.9. VARIANTES IDENTIFICADAS POR SEQUENCIAMENTO DE SANGER

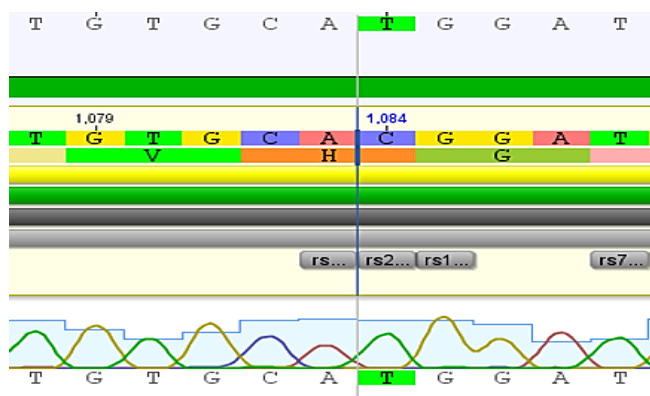


**Figura 9.8.1.** Detecção da variante *rs77375493* (*JAK2V617F*) com presença de alelos variantes em homozigose (TT). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).

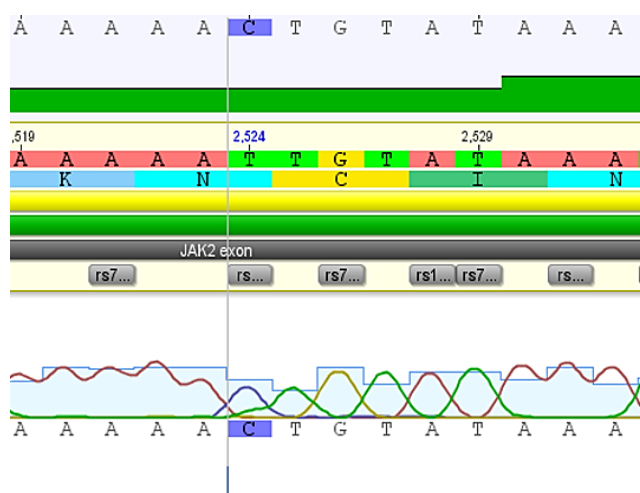


**Figura 9.8.2.** Detecção da variante *rs2230724* com presença de alelos variantes em homozigose (AA). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).

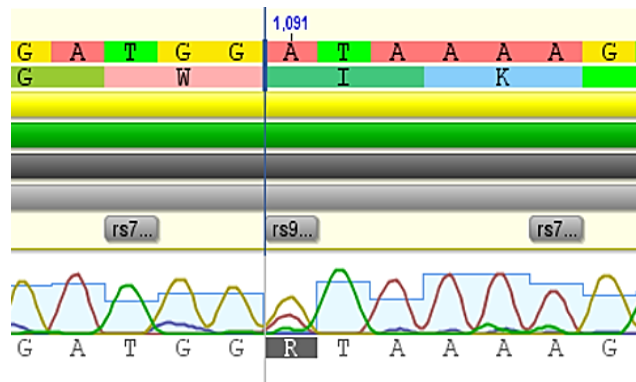




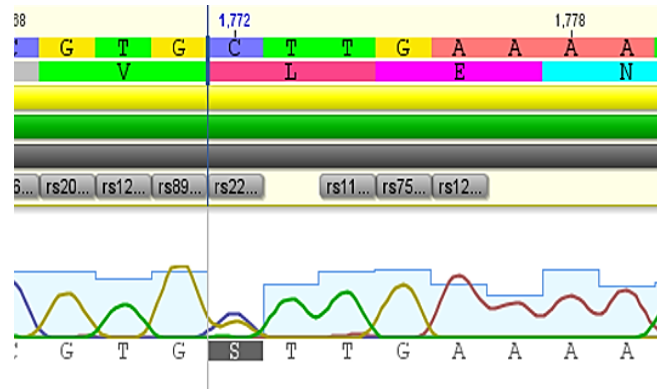
**Figura 9.8.3.** Detecção da variante *rs2230722* com presença de alelos variantes em homozigose (TT). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).



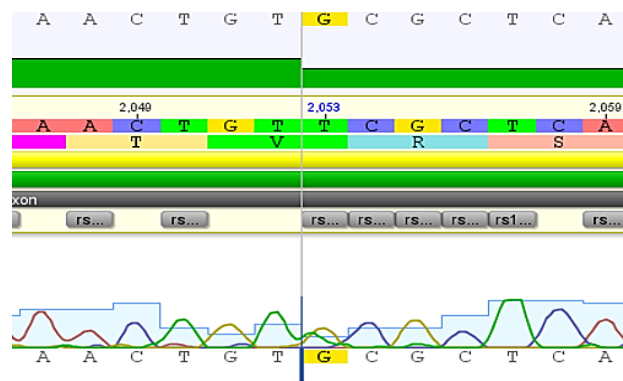
**Figura 9.8.4.** Detecção da variante *rs2230728* com presença de alelos variantes em homozigose (CC). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).



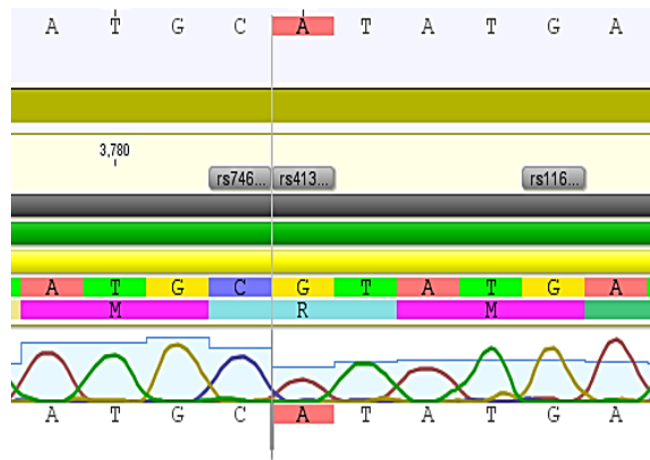
**Figura 9.8.5.** Detecção da variante *rs907414891* com presença de alelos variantes em heterozigose (AG). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).



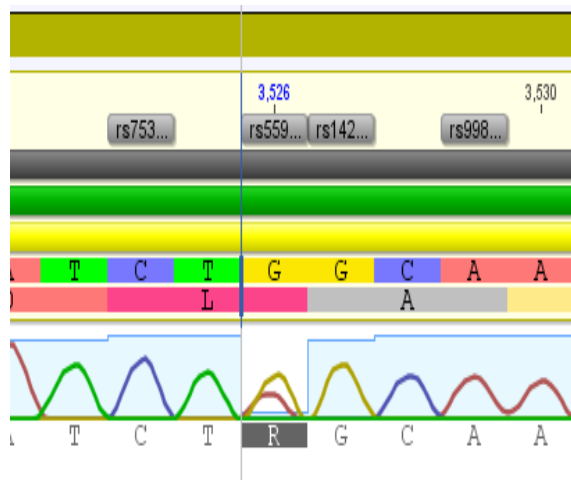
**Figura 9.8.6.** Detecção da variante *rs2230723* com presença de alelos variantes em heterozigose (CG). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).



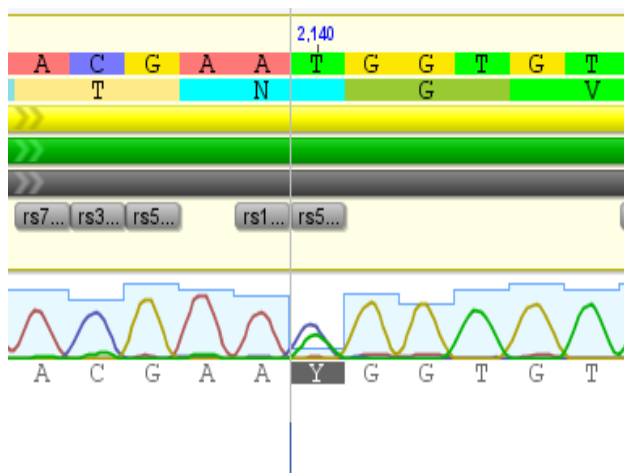
**Figura 9.8.7.** Detecção da variante *rs10119726* com presença de alelos variantes em heterozigose (TG). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).



**Figura 9.8.8.** Detecção da variante *rs41316003* com presença de alelos variantes em homozigose (AA). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).



**Figura 9.8.9.** Detecção da variante *rs55930140* com presença de alelos variantes em heterozigose (GA). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).



**Figura 9.8.10.** Detecção da variante *rs576746768* com presença de alelos variantes em heterozigose (TC). Sequência alinhada com o transcrito 2 de *JAK2* (NM\_001322194).