



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA  
DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A  
HEMATOLOGIA**



**ESTUDO DO HAPLÓTIPO 46/1 E PROMOTOR DO GENE *JAK2* EM PACIENTES  
COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS *BCR::ABL1* NEGATIVAS  
ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

**JHEMERSON FERNANDES PAES**

**MANAUS – AM**

**2023**

**JHEMERSON FERNANDES PAES**

**ESTUDO DO HAPLÓTIPO 46/1 E PROMOTOR DO GENE *JAK2* EM PACIENTES  
COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS *BCR::ABL1* NEGATIVAS  
ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

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 como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andrea Monteiro Tarragô

**MANAUS – AM**

**2023**

### 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.**

J59ee Paes, Jhemerson Fernandes  
Estudo do haplótipo 46/1 e promotor do gene JAK2 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas BCR::ABL1 negativas atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas / Jhemerson Fernandes Paes. Manaus : [s.n], 2023.  
180 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Lucivana Prata de Souza Mourão  
Coorientador: Andrea Monteiro Tarragô

1. Janus quinase. 2. neoplasias mieloproliferativas. 3. haplótipo. 4. regiões promotoras genéticas. 5. variação genética. I. Lucivana Prata de Souza Mourão (Orient.). II. Andrea Monteiro Tarragô (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Estudo do haplótipo 46/1 e promotor do gene JAK2 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas BCR::ABL1 negativas atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM**



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 004/2023**

Ao décimo nono dia do mês de julho do ano de 2023, às 14h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação do discente **Jhemerson Fernandes Paes**, sob o título: **“Estudo do haplótipo 46/1 e promotor do gene JAK2 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas BCR::ABL1 negativas atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”**, tendo como orientadora a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Lucivana Prata de Souza Mourão** e coorientadora a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Andréa Monteiro Tarragô**, 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.

| <b>Membros</b>   | <b>Parecer</b>   | Documento assinado digitalmente   |
|--|--|---|
| Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Lucivana Prata de Souza Mourão – Presidente (UEA)    | Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/><br>Reprovado(a) <input type="checkbox"/> | Assinatura: <b>LUCIVANA PRATA DE SOUZA MOURAO</b><br>Data: 20/07/2023 11:39:55-0300<br>Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a><br>CPF: 600.963.572-15      |
| Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Maria da Conceição Freitas dos Santos – Membro (UEA) | Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/><br>Reprovado(a) <input type="checkbox"/> | Assinatura: <b>MARIA DA CONCEICAO FREITAS DOS SANT</b><br>Data: 26/07/2023 17:48:48-0300<br>Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a><br>CPF: 456.392.482-20 |
| Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Aya Sadahiro – Membro (UFAM)                         | Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/><br>Reprovado(a) <input type="checkbox"/> | Assinatura: <b>AYA SADAHIRO</b><br>Data: 24/07/2023 21:21:25-0300<br>Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a><br>CPF: 128.412.458-45                        |

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

Aprovado

Não Aprovado

Documento assinado digitalmente  
 **LUCIVANA PRATA DE SOUZA MOURAO**  
Data: 20/07/2023 11:42:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

**Coordenação PPGH-UEA/HEMOAM**

- Endereço: Avenida Constantino Nery, 4397 – Chapada
- Manaus-AM – CEP 69050-001 / • Fone: (92) 3655-0123
- E-mail<sup>s</sup>: [mestrado@hemoam.am.gov.br](mailto:mestrado@hemoam.am.gov.br)
- Site: <http://www.pos.uea.edu.br/hematologia>
- [www.instagram.com/ppgh\\_uea](http://www.instagram.com/ppgh_uea)





## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta pesquisa:

Aos meus pais-avós: José Alves de Lima e Maria José Fernandes de Lima por todo suporte, amor e exemplos dados ao longo de toda minha vida

A Profa. Dra. Lucivana de Prata Souza Mourão, Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô, e Prof. Dr. George Allan Villarouco pela inspiração, por me mostrar a importância da ciência e da pesquisa.

E a todos os pacientes com compartilharam sua confiança, seu tempo e suas histórias comigo e fizeram todas as descobertas aqui descritas possíveis.

## AGRADECIMENTOS

Acredito que a ciência não pode ser feita sozinha. Sempre precisamos de pessoas que sejam nossa estrutura, nossos pilares e nosso apoio nos momentos felizes, nas incertezas e nos momentos difíceis dessa caminhada. É muito importante lembrar e agradecer aqueles que fizeram parte desse processo.

Meus primeiros agradecimentos vão para meus pais-avós: José Alves de Lima e Maria José Fernandes de Lima. Duas pessoas que me ensinaram o que é virtude, princípios e sempre me incentivaram a estudar e crescer. Filhos de ribeirinhos, do interior do Amazonas, que com o pouco que tinham nunca vacilaram em disponibilizar o melhor para mim, meus irmãos e primos. Criaram quatro filhos, nove netos e sempre disponibilizaram o melhor que podiam, mesmo quando não podiam. “Eles me mostraram o caminho certo para seguir, me ensinaram a enxergar os espinhos das flores que podem ferir, me encorajaram a dar os primeiros passos na vida para ser quem sou” (Toada: Matriarca – Boi Bumbá Caprichoso, 2019).

Agradeço também aos meus irmãos, Adriely Lima e Gustavo Paes, e à minha mãe, Silvania Fernandes de Lima, e a toda a minha família: Anaile, Kauê, José Maria (Dunga) e todos que estiveram presentes durante todo esse processo de diferentes formas. No fim das contas, isso é por mim e por eles, pelas minhas raízes, pelos meus!

Agradeço ao meu pilar, minha bússola, meu apoio durante todo o processo: Igo Said. Ele foi a pessoa que me manteve de pé, enxugou minhas lágrimas e disse que tudo daria certo. Esteve ao meu lado nos meus momentos mais alegres, mais sensíveis e nos mais delicados. Me reergueu quando nem eu mais acreditava em mim, sacrificou noites e dias apenas para me dar o suporte que eu precisava. Obrigado por tornar meus dias mais leves, mais bonitos e mais completos apenas por estar ao meu lado, por me fazer amar nos pequenos detalhes. Obrigado por acrescentar e não apenas completar, por me fazer sentir um sentimento tão grandioso como o rio Amazonas: "livre, imponente, sereno (...)", um sentimento descrito como um amor onde só ele "faz meu mundo, minha estrela brilhar (...)" (Toada: Sensibilidade - Boi Bumbá Caprichoso, 2012).

Aos meus filhos felinos: Maria e Caetanos que foram meus mais fiéis companheiros nas noites que fiquei acordado, que me recebiam ao chegar em casa ou somente. Obrigado pelo amor e carinho que me transmitem apenas por existir.

Agradeço a todos os pacientes que tornaram possível este estudo, que confiaram em mim suas histórias, vivências e, muitas vezes, tempo valioso. Por me ensinarem lições valiosas, seja em conversas longas ou em contatos rápidos, em telefonemas esporádicos para

esclarecimento de informações ou em questionamentos para entender melhor o trabalho. Por acreditarem que a ciência pode ajudá-los. Este trabalho não seria possível sem eles.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão, um dos meus maiores exemplos como profissional e pessoa que tenho em minha vida. Suas orientações foram além da pesquisa, envolvendo também a vida. Suas lições e ensinamentos serão lembrados como alguns dos melhores momentos dessa jornada. Obrigado por confiar em meu trabalho desde os tempos de iniciação tecnológica na Universidade Federal do Amazonas. Se amadureci durante esse processo, grande parte se deve aos seus ensinamentos.

Agradeço também à minha coorientadora, Dra. Andrea Monteiro Tarragô, que esteve ao meu lado durante toda essa longa caminhada. Ela sempre viu na pesquisa uma forma de melhorar a vida das pessoas, de fornecer um retorno positivo para a sociedade e fazer a diferença na vida das pessoas. Obrigado por todos esses ensinamentos, por não me deixar desanimar nos momentos mais delicados e por se colocar no lugar do outro.

Ao Dr. George Allan Villarouco, que caminhou ao meu lado no último ano de mestrado, teve paciência para me ensinar durante esse processo e sempre se mostrou disponível para ajudar, independentemente das circunstâncias. Obrigado pela confiança em meu trabalho, por acreditar em meu potencial e por ter uma grande participação na minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de mestrado, pela companhia durante todo esse processo. Compartilhamos risos, choros e superações. Superamos medos, expectativas e dificuldades.

A Dania G. Torres, que iniciou todas as atividades do projeto de neoplasias mieloproliferativas. Obrigado pela companhia durante todo esse processo, pelas risadas, pela companhia e pelos ensinamentos.

Às alunas que compõem a equipe de neoplasias mieloproliferativas: Erycka, Emanuela, Miliane e Déborah, as quais se tornaram parceiras de pesquisa. Destaco aqui o apoio incondicional que Déborah sempre me deu, tornando-se também uma companheira de vida. Obrigado por todo o apoio nesse processo, pelas noites em claro, pelas madrugadas acordadas para coletas. Vocês foram verdadeiras guerreiras que tornaram possível a execução dessa pesquisa. Meu eterno agradecimento.

À Karolaine Bentes, minha amiga, irmã e parceira que me ajudou durante essa pesquisa, especialmente na análise estatística. Obrigado pela paciência, pelo empenho e por nunca hesitar em me ajudar nesse processo complexo.

A todos do Laboratório de Genômica que sempre se mostraram presente, seja em conversas, ajudas ou ensinamentos. Obrigado pelos feedbacks, pelas dicas e conversas que

sempre aliviavam a tensão dos experimentos. Vocês tornaram esse processo mais leve e proveitoso.

Aos colaboradores do laboratório clínico, SAME, médicos e outros setores da Fundação Hemoam, que viabilizaram as etapas iniciais desse projeto e tornaram possível sua execução.

A coordenação do programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia pelos diversos esclarecimentos prestados, pelas dicas repassadas e também por todo o apoio dado durante os dois anos de mestrado. Pela compreensão e pela humanidade com que tratam os alunos em todos os momentos.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em especial ao Laboratório de Genômica no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), que tornaram possível a análise molecular. Um agradecimento especial à Dra. Enedina Nogueira e ao Dr. Adolfo Mota (responsável pela minha inserção na vida científica durante o PIBIC em 2018) por nos darem suporte diretamente.

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) por toda a estrutura e oportunidades oferecidas durante o período de mestrado. Todas as experiências tornaram a experiência acadêmico-profissional mais proveitosa e satisfatória.

A Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de ingresso no programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização da pesquisa e à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEAM) pela concessão da bolsa e por tornar realidade a execução da 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.

## EPÍGRAFE

Durante séculos, poetas, curandeiros e filósofos viram e descreveram a estreita ligação entre sangue e vida. Não é assim com a medula. Seu papel de sementeira de sangue estava oculto, como uma semente no solo.

Tavassoli (1980) - "*Medula óssea: a sementeira de sangue*"  
*em Wintrobe's Blood: Pure and Eloquent*

## RESUMO

**Introdução:** Neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas são doenças hematológicas caracterizadas por hiperplasia dos elementos mielóides. Trombocitemia essencial, policitemia vera e mielofibrose são as mais frequentes dentro desse grupo de doenças e podem ser diferenciadas por achados clínicos, laboratoriais e genéticos. *JAK2V617F* é uma alteração genética comum em neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas e está associado ao haplótipo 46/1, onde localiza-se *rs10974944* (C>G), variante localizada no íntron 12 do gene *JAK2* e marcador genético deste haplótipo. Esse haplótipo também influencia as alterações laboratoriais, frequência alélica das variantes e correlações com neoplasias mieloproliferativas familiares. A região promotora também exerce papel na modulação dentro do cenário etiopatogênico de outras neoplasias, todavia, nas mieloproliferativas ainda pouco se conhece sobre a ação de variantes nessa porção gênica. **Objetivo:** avaliar a presença do haplótipo 46/1 e a região promotora do gene *JAK2*. **Metodologia:** foram incluídos no estudo 108 indivíduos diagnosticados clinicamente com policitemia vera (n=39), trombocitemia essencial (n=61) e mielofibrose (n=8). Dados clínicos, laboratoriais e análises moleculares por reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de Sanger foram importantes para obtenção dos dados. **Resultados:** No íntron 12 foram identificadas, além de *rs10974944* (C>G), as variantes *rs10119004* (A>G), *rs1081515* (G>T) e *rs59720809* (A>G). Indivíduos com policitemia vera e portadores do alelo G de *rs10974944* apresentaram valores significativamente aumentados de volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, no grupo de trombocitemia essencial, foram observados níveis elevados de glóbulos vermelhos, hematócrito e hemoglobina ( $p < 0,05$ ). Foi observada uma associação entre a frequência genotípica de *rs10974944* (G) e o status da variante *JAK2V617F*. Indivíduos com o alelo G e o genótipo GG de *rs10974944* apresentaram uma associação significativa com o status positivo para *JAK2V617F* ( $p < 0,05$ ), assim como um aumento na frequência alélica da variante. Além disso, *rs10815151* demonstrou uma associação com o status negativo para *JAK2V617F*. Na região promotora foram identificadas *rs6476933* (C>T), *rs189703877* (A>C), *rs73389454* (A>C), *rs1887428* (G>C) e *rs1887429* (G>T). O alelo G de *rs1887428* demonstrou-se mais frequente em pacientes *JAK2V617F* positivo VAF $\geq$ 50%, ao passo que o alelo variante (C) apresentou relação inversa. *rs6476933* (C>T), *rs1887428* (G>C) *rs1887429* (G>T) aparentemente criam sítios de fatores de transcrição. **Conclusão:** *rs10974944* (G) demonstrou-se associada ao status positivo para *JAK2V617F*, bem como alterações laboratoriais e um aumento na frequência alélica da variante ao passo que *rs10815151* demonstrou-se como um fator protetor a *JAK2V617F* na população estudada. Já *rs1887428* apresentou provável papel na regulação de *JAK2*, onde a criação de sítio de fatores de transcrição altera a expressão do gene.

**Palavras-chave:** Janus quinase, neoplasias mieloproliferativas, haplótipo, regiões promotoras genéticas, variação genética.

## ABSTRACT

**Introduction:** *BCR::ABL1* negative myeloproliferative neoplasms are hematological disorders characterized by hyperplasia of myeloid elements. Essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis are the most frequent diseases within this group and can be differentiated by clinical, laboratory, and genetic findings. *JAK2V617F* is a common genetic alteration in *BCR::ABL1*- negative myeloproliferative neoplasms and is associated with the 46/1 haplotype, where the *rs10974944* (C>G) variant is located in intron 12 of the *JAK2* gene and serves as a genetic marker for this haplotype. This haplotype also influences laboratory alterations, allelic frequency of the variants, and correlations with familial myeloproliferative neoplasms. The promoter region also plays a role in the modulation within the etiopathogenic scenario of other neoplasms; however, little is still known about the action of variants in this gene segment in myeloproliferative diseases. **Objective:** To evaluate the presence of the 46/1 haplotype and the promoter region of the *JAK2* gene. **Methodology:** The study included 108 individuals clinically diagnosed with polycythemia vera (n=39), essential thrombocythemia (n=61), and myelofibrosis (n=8). Clinical, laboratory, and molecular analyses using polymerase chain reaction and Sanger sequencing were important for obtaining the data. **Results:** In intron 12, in addition to *rs10974944* (C>G), the variants *rs10119004* (A>G), *rs1081515* (G>T), and *rs59720809* (A>G) were identified. Individuals with polycythemia vera and carriers of the *rs10974944* G allele showed significantly increased mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin values ( $p < 0.05$ ). On the other hand, the essential thrombocythemia group showed elevated levels of red blood cells, hematocrit, and hemoglobin ( $p < 0.05$ ). An association was observed between the genotypic frequency of *rs10974944* (G) and the status of the *JAK2V617F* variant. Individuals with the G allele and the GG genotype of *rs10974944* showed a significant association with a positive status for *JAK2V617F* ( $p < 0.05$ ), as well as an increased allelic frequency of the variant. Furthermore, *rs10815151* showed an association with a negative status for *JAK2V617F*. In the promoter region, the variants *rs6476933* (C>T), *rs189703877* (A>C), *rs73389454* (A>C), *rs1887428* (G>C), and *rs1887429* (G>T) were identified. The G allele of *rs1887428* was more frequent in *JAK2V617F*-positive patients with a VAF $\geq$ 50%, while the variant allele (C) showed an inverse relationship. *rs6476933* (C>T), *rs1887428* (G>C), and *rs1887429* (G>T) apparently create transcription factor binding sites. **Conclusion:** *rs10974944* (G) was found to be associated with a positive status for *JAK2V617F*, as well as laboratory alterations and an increase in the allelic frequency of the variant, while *rs10815151* was shown to be a protective factor against *JAK2V617F* in the studied population. Additionally, *rs1887428* likely plays a role in the regulation of *JAK2*, where the creation of a transcription factor binding site alters the gene expression.

**Keywords:** Janus kinase, myeloproliferative neoplasms, haplotype, genetic promoter regions, genetic variation.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Modelo clássico de hematopoiese e seus subprocessos.....  | 27 |
| <b>Figura 2:</b> Modelo atual da hematopoiese.....   | 28 |
| <b>Figura 3:</b> Principais marcos históricos envolvendo as descobertas relacionadas as NMPs.....  | 31 |
| <b>Figura 4:</b> Processo de sinalização da via JAK/STAT.....  | 36 |
| <b>Figura 5:</b> Localização, estrutura e transcritos do gene <i>JAK2</i> .....  | 38 |
| <b>Figura 6:</b> Estrutura da proteína JAK2.....   | 39 |
| <b>Figura 7:</b> Frequência da variante <i>JAK2V617F</i> e variantes no éxon 12 em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas <i>BCR::ABL1</i> negativas..... | 40 |
| <b>Figura 8:</b> Representação do haplótipo 46/1.....  | 42 |
| <b>Figura 9:</b> Localização das variantes identificadas em estudos direcionados ao haplótipo 46/1 e suas respectivas informações descritas na literatura.....           | 44 |
| <b>Figura 10:</b> MAF dos marcadores do haplótipo 46/1.....  | 44 |
| <b>Figura 11:</b> Ação do haplótipo 46/1 considerando a hipótese de hipermutabilidade e solo fértil em atuação mútua.....  | 45 |
| <b>Figura 12:</b> Fluxograma de atividades do projeto.....   | 50 |
| <b>Figura 13:</b> Processo de coleta, identificação, aliquotagem e armazenamento de amostra.....   | 51 |
| <b>Figura 14:</b> Processo de extração de DNA e precipitação de DNA.....   | 52 |
| <b>Figura 15:</b> Estratégia para o desenho dos <i>primers</i> para as regiões de interesse no presente estudo: [A] região promotora e [B] íntron 12.....                | 54 |

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

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Linha do tempo das neoplasias mieloproliferativas. ....   | 62 |
| <b>Figura 2.</b> Mutações condutoras nos genes <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> e <i>CALR</i> associadas a neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPs)..... | 64 |
| <b>Figura 3.</b> Via de sinalização <i>JAK/STAT</i> .....  | 67 |
| <b>Figura 4.</b> Caracterização do haplótipo 46/1 sem o gene <i>JAK2</i> .....   | 68 |
| <b>Figura 5.</b> A imunotrombose envolve a participação de células hematopoiéticas e células do sistema imunológico. ....                              | 70 |

### CAPÍTULO II: The Contribution of JAK2 46/1 Haplotype in the Predisposition to Myeloproliferative Neoplasms

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1.</b> Mecanismos relacionados à dissomia uniparental adquirida em células-tronco pluripotentes hematopoiéticas.....        | 91  |
| <b>Figura 2.</b> Representação esquemática do haplótipo 46/1 com base na sequência de referência do gene <i>JAK2</i> (NG_009904)..... | 95  |
| <b>Figura 3.</b> Localização das variantes identificadas nos estudos direcionados ao haplótipo 46/1.....                              | 97  |
| <b>Figura 4.</b> Frequência de alelos menores (MAF) dos marcadores de haplótipo 46/1.....   | 97  |
| <b>Figura 5.</b> Possível associação do haplótipo 46/1 e NMPs. ....   | 101 |

**CAPÍTULO III:** Estudo do íntron 12 de *JAK2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas BCR::*ABL1*- na Amazônia Brasileira: influência no status de *JAK2V617F*, frequência alélica variante e manifestações hematológicas

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) do íntron 12 de <i>JAK2</i> em pacientes com policitemia vera (PV) e trombocitemia essencial (TE)..... | 125 |
|--|-----|

**CAPÍTULO IV:** *Fatores genéticos associados à regulação das doenças mieloproliferativas BCR::*ABL1*–: uma abordagem feita na população da Amazônia brasileira*

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) de variantes do promotor, íntron 12 e éxon 14 de <i>JAK2</i> em pacientes com policitemia vera (PV) e trombocitemia essencial (TE)..... | 143 |
|---|-----|

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR.....54

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

**Tabela 1.** Critérios diagnósticos para neoplasias mieloproliferativas crônicas clássicas negativas para *BCR/ABL1*.....63

### **CAPÍTULO II:** *The Contribution of JAK2 46/1 Haplotype in the Predisposition to Myeloproliferative Neoplasms*

**Tabela 1.** Características das neoplasias mieloproliferativas negativas para *BCR-ABL1*. NMP: neoplasias mieloproliferativas.....88

**Tabela 2.** Variantes de nucleotídeo único (SNVs) identificadas nos estudos do haplótipo 46/1 e suas respectivas informações descritas na literatura.....96

**Figura 3.** Localização das variantes identificadas nos estudos direcionados ao haplótipo 46/1. O mapeamento das variantes ao longo do gene foi realizado com base na sequência de referência (NG\_009904).....97

### **CAPÍTULO III:** *Estudo do íntron 12 de JAK2 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas BCR::ABL1- na Amazônia Brasileira: influência no status de JAK2V617F, frequência alélica variante e manifestações hematológicas*

**Tabela 1:** Características clínicas e laboratoriais de pacientes com neoplasias mieloproliferativas.....119

**Tabela 2:** Frequência genotípica e alélica de SNVs identificados em pacientes com neoplasias mieloproliferativas incluídos no estudo.....120

**Tabela 3:** Características laboratoriais de pacientes com policitemia vera e o alelo G de *rs10974944* .....121

**Tabela 4:** Características laboratoriais de pacientes com trombocitemia essencial e alelo G de *rs10974944*.....122

**Tabela 5:** Distribuição de SNVs em pacientes NMPs estratificados de acordo com o status de *JAK2V617F*.....123

**Tabela 6:** Distribuição de SNVs em pacientes NMPs estratificados de acordo com a VAF de *JAK2V617F* .....124

**Tabela 7:** Haplótipos do íntron 12 do gene *JAK2* presente em indivíduos com policitemia vera (PV) e trombocitemia essencial (TE).....125

**CAPÍTULO IV: Fatores genéticos associados à regulação das doenças mieloproliferativas**  
*BCR::ABL1–: uma abordagem feita na população da Amazônia brasileira*

**Tabela 1:** distribuição alélica e genotípica de SNVs do promotor de acordo com NMP, status de *JAK2V617F* e Frequência alélica variante.....139

**Tabela 2:** distribuição alélica e genotípica de SNVs do promotor de acordo com NMP, status de 46/1 e *rs10815151 (C>T)*.....141

**Tabela 3:** haplótipos do promotor e íntron 12 do gene *JAK2* presente em indivíduos com policitemia vera e trombocitemia essencial.....143

**LISTA DE QUADROS**

|   |     |
|---|-----|
| <b>Quadro 1:</b> Critérios de diagnósticos para policitemia vera (OMS, 2022).....                   | 32  |
| <b>Quadro 2:</b> Critérios de diagnósticos para trombocitemia essencial (OMS, 2022).....            | 34  |
| <b>Quadro 3:</b> Critérios de diagnósticos para mielofibrose primária (OMS, 2022).....              | 35  |
| <b>Quadro 4:</b> Critérios de diagnósticos para mielofibrose primária fibrótica (OMS, 2022) .....   | 35  |
| <b>Quadro 5:</b> primers desenhados para as reações de PCR.....                                     | 52  |
| <b>Quadro 6:</b> ciclagem utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR).....                    | 53  |
| <br>  |     |
| <b>CAPÍTULO IV:</b> <i>Fatores genéticos associados à regulação das doenças mieloproliferativas</i> |     |
| <i>BCR::ABL1–: uma abordagem feita na população da Amazônia brasileira</i>                          |     |
| <b>Quadro 1:</b> Caracterização de variantes identificadas na região promotora.....                 | 137 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

% – Porcentagem

%GC – Percentual Guanina–citosina

A – Adenina

alo–HSCT – *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation* (Transplante alogênico de células–tronco hematopoiéticas)

aPTT– Tempo de tromboplastina parcial ativada

aUPD – *Acquired uniparental disomy* (Dissomia uniparental adquirida)

*BCR::ABL1* – Rearranjo gênico *BCR::ABL1*

C – Citosina

c. – DNA codificante

CAAE – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

*CARL* – Gene da calreticulina

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CID – Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde

CNN–LOH – *Copy number losses and Loss of heterozygosity* (Perda neutra de heterozigidade do número de cópias)

CTH– Células–tronco hematopoiética

CXCL – *Chemokine ligand* (Ligante de quimiocina)

CXCL4: *Platelet factor 4* (Quimiocina de Ligando 4 ou Fator plaquetário 4)

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos

DAU – Dissomia Uniparental Adquirida

DHL – Lactato desidrogenase

DHL: Lactato Deidrogenase

DL – Desequilíbrio de ligação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNMT3A: *DNA methyltransferase 3 alpha* (DNA Metil-Transferasa 3)

dNTP – desoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra–acético)

EPO – Eritropoietina

EPOR – *Erythropoietin Receptor* (Receptor de eritropoietina)

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase* (Quinase regulada por sinais extracelulares)

F – Fenilalanina

FHEMOAM – Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas  
FLT3 – Fator estimulador de colônia de macrófagos  
G – Guanina  
g. – Sequência de referência genômica linear  
GCP – Declaração de Helsinque e de Boas Práticas Clínicas  
G-CSFR – *Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor* (Receptor de fator estimulador de colônia de granulócitos)  
GGCC\_46/1 – Haplótipo 46/1  
H – *Harpin*  
H2O<sub>dd</sub> – água dupla destilada  
Hb– Hemoglobina  
HCM – Hemoglobina corpuscular média  
HCV – Vírus da hepatite C  
HD – *Heterodímero*  
HGNC – Gene Nomenclature Committee  
HGNC - *HUGO Gene Nomenclature Committee*  
HIF – *Hypoxia inducible factor* (Fatores induzíveis por hipóxia)  
HLA – *Human Leucocyte Antigen* (Antígeno leucocitário humano)  
Ht – Hematócrito  
HU – Hidroxiureia  
IC – Intervalo de confiança  
ICAM-1 – *Intercellular adhesion molecule 1* (Moléculas intercelulares moléculas de adesão)  
ID – Identificador  
IFN – Interferon  
IIQ – Tntervalo interquartil  
IL – Interleucina  
INR – Razão internacional normalizada  
*INSL4 – Insulin like 4*  
*INSL6 – Insulin like 6*  
JAK1 – Janus quinase 1  
*JAK2 – Janus quinase 2 (gene)*  
JAK2 – Janus quinase 2  
JAK3 – Janus quinase 3  
kDa – quilodalton  
KIT – *Proto-oncogene receptor tyrosine kinase* (Receptor proto-oncogênico tirosina quinase)  
LEC – Leucemia Eosinofílica Crônica

LMA – Leucemia Mieloide Auda  
LMC – Leucemia Mieloide Crônica  
LNC – Leucemia Neutrófila Crônica  
MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinases* (Proteína quinase ativada por mitogênio)  
MF – Mielofibrose  
MFP – Mielofibrose primária  
MF-pós-PV: Mielofibrose pós-policitemia vera  
MF-pós-TE: Mielofibrose pós-trombocitemia essencial  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
mM – milimolar  
MPL – Receptor de trombopoietina  
MPL *Thrombopoietin receptor* (Receptor da Trombopoietina)  
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro  
mTOR – *Mammalian target of rapamycin* (Alvo de rapamicina de mamífero)  
NaCl – Cloreto de sódio  
NC – *Complete genome* (Genoma completo)  
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*  
NETs – *Neutrophil extracellular traps* (Armadilhas extracelulares de neutrófilos)  
NF1 – *Neurofibromatosis type 1*  
NF-κB: *Nuclear factor-κB* (Fator Nuclear- kappa B)  
NGS – Sequenciamento de próxima geração  
NMP – Neoplasias Mieloproliferativas crônicas  
NRAS – *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OR – *Odds ratios*  
P13K – *Phosphatidylinositol-3-kinase* (Fosfatidilinositol-3'-quinase)  
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos  
PAR4 – *Protease-activated receptor 4* (Receptor da proteinase 4)  
pb – Pares de base  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas  
PECAM – Moléculas de adesão plaquetária–endoteliais  
PEG – Polietilenoglicol  
Ph – Cromossomo Filadélfia  
PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfatidil-Inositol Quinase 3)  
PT – Tempo de protrombina



PTPN11 – Proteína Tirosina Fosfatase não Receptora Tipo 11  
PV – Policitemia vera  
RBC – Contagem de eritrócitos  
RBPJ – *Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin Kappa J Region*  
Rcf – Força Centrífuga Relativa  
Ref. Seq. – *Reference sequence* (Sequência de referência)  
RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
SD – *Selfdímero*  
SF3B1: *Splicing Factor 3B Subunit 1*  
SH2 – Src Homologia 2  
SH2B3: *SH2B adaptor protein 3*  
SNV – *Single nucleotide variant* (Variante de nucleotídeo único)  
SOCS: *Suppressor of cytokine signaling* (Supressor de citocina de sinalização)  
STAT – *Transcription factor signal transducer receptor complex and transcription activator*  
(Complexo receptor do transdutor de sinal dos fatores de transcrição e ativador da transcrição)  
T – Timina  
TANs – *Tumor-associated neutrophils* (Neutrófilos associados a tumores)  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TE – Trombocitemia essencial  
TET2: *Ten Eleven Translocation 2* (Dez-Onze-Translocação 2)  
TF – Fatores de transcrição  
Tm – Temperatura de anelamento  
TNF – *Tumor necrosis facto* (Fator de necorse tumoral)  
TP53: Tumor protein p53 (Proteína tumoral 53)  
TPO: Trombopoetina  
TRF1: Transferrina 1  
TYK2: Tirosina quinase 2  
U - Unidade  
V – Valina  
VAF– Frequência alélica variante  
VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule 1* (Moléculas de adesão de células vasculares)  
VCM – Volume corpuscular médio  
WBC – Contagem de leucócitos  
 $\mu\text{L}$  – microlitro  
 $\mu\text{M}$  – micromolar

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 24 |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....  | 27 |
| 2.1. Hematopoiese.....   | 27 |
| 2.2. Neoplasias mieloproliferativas.....   | 29 |
| 2.2.1. Histórico das neoplasias mieloproliferativas .....                        | 29 |
| 2.2.2. Caracterização das Neoplasias mieloproliferativas .....                   | 31 |
| 2.2.2.1. Policitemia vera (PV) .....   | 31 |
| 2.2.2.1.1. Critérios de diagnóstico .....  | 32 |
| 2.2.2.2. Trombocitemia essencial .....   | 32 |
| 2.2.2.2.1. Critérios de diagnóstico .....  | 33 |
| 2.2.2.3. Mielofibrose.....   | 34 |
| 2.2.2.3.1. Critérios de diagnóstico .....  | 34 |
| 2.2.3. Via de sinalização das neoplasias mieloproliferativas.....                | 35 |
| 2.2.4. Gene <i>Janus quinase (JAK2)</i> .....                                    | 37 |
| 2.2.4.1. <i>JAK2V617F</i> .....  | 39 |
| 2.2.4.2. Haplótipo 46/1.....   | 41 |
| 2.2.4.2.1. Associação entre o haplótipo 46/1 e a variante <i>JAK2V617F</i> ..... | 44 |
| 2.2.4.2.2. O haplótipo 46/1 e hereditariedade das NMPs.....                      | 45 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | 48 |
| 3.1. Objetivo geral .....  | 48 |
| 3.2. Objetivos específicos.....  | 48 |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 49 |
| 4.1. Tipo e área de estudo.....  | 49 |
| 4.2. População do estudo.....  | 49 |
| 4.3. Recrutamento de pacientes .....   | 49 |
| 4.4. Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão .....                        | 49 |
| 4.5. Fluxograma de trabalho.....   | 50 |
| 4.6. Aspectos éticos.....  | 50 |
| 4.7. Coleta de dados do prontuário .....   | 51 |
| 4.8. Coleta de sangue e armazenamento .....                                      | 51 |

|   |            |
|---|------------|
| 4.9. Extração de DNA.....   | 51         |
| 4.10. Análise molecular.....  | 52         |
| 4.10.1. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores.....   | 53         |
| 4.10.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....   | 54         |
| 4.10.3. Purificação da PCR com polietilenoglicol (PEG).....   | 55         |
| 4.10.4. Sequenciamento e análise de sequências.....   | 55         |
| 4.11. Análise de DL e haplótipos.....   | 56         |
| 4.13. Cronograma de atividades.....   | 57         |
| 4.14. Equipe do projeto.....  | 58         |
| 4.15. Financiamento e infraestrutura.....   | 59         |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>60</b>  |
| CAPÍTULO I: <i>JAK2</i> Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms.....   | 60         |
| CAPÍTULO II: The Contribution of <i>JAK2</i> 46/1 Haplotype in the Predisposition to Myeloproliferative Neoplasms.....  | 86         |
| CAPÍTULO III: Estudo do íntron 12 de <i>JAK2</i> em pacientes com neoplasias mieloproliferativas <i>BCR::ABL1</i> - na Amazônia Brasileira: influência no status de <i>JAK2V617F</i> , frequência alélica variante e manifestações hematológicas..... | 114        |
| CAPÍTULO IV: Fatores genéticos associados à regulação das doenças mieloproliferativas <i>BCR::ABL1</i> - : uma abordagem feita na população da Amazônia brasileira.....   | 132        |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>148</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>149</b> |
| <b>8. ANEXOS.....</b>   | <b>157</b> |
| 8.1. Parecer consubstanciado do projeto Caracterização molecular de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas.....  | 157        |
| 8.2. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....   | 162        |
| 8.3. Instrumento de coleta de dados.....  | 166        |
| 8.4. Protocolo de extração de DNA.....  | 167        |
| 8.5. Padronização de concentração das amostras de DNA.....  | 168        |
| 8.6. Protocolo – Reação em cadeia da polimerase: íntron 12.....   | 171        |
| 8.7. Protocolo – Reação em cadeia da polimerase: Promotor.....  | 171        |
| 8.8. Protocolo: Precipitação de produto da PCR com Polietilenoglicol (PEG).....   | 174        |
| 8.9. Preparação do mastex mix para sequenciamento.....  | 175        |

|   |     |
|---|-----|
| 8.10. Purificação do sequenciamento (Método EDTA/Etanol) .....  | 176 |
| 8.11. Preparação de amostras pré-leitura no sequenciador.....   | 176 |
| 8.12. Variantes identificadas por sequenciamento de Sanger..... | 177 |
| 8.13. Resumos publicados em anais de eventos .....              | 178 |
| 8.14. Divulgação científica e participação em eventos .....     | 180 |

## 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) são doenças clonais de célula-tronco hematopoiética caracterizadas por hiperplasia de um ou mais elementos da série mieloide com maturação eficaz, resultando em leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocitária e podem evoluir para fibrose medular ou transformação leucêmica (1–3). Com uma incidência de 6 casos a cada 100.000 habitantes, estas patologias atingem majoritariamente indivíduos entre 60 e 70 anos, sendo a maioria do sexo masculino e de raça branca (3,4).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em sua 5ª edição da classificação de Tumores de Tecidos Hematopoiéticos e Linfoides enquadra as NMPs nas seguintes malignidades hematológicas: leucemia mieloide crônica (LMC) (apresenta o rearranjo *BCR-ABL1*), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MF), leucemia neutrofilica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica (LEC), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) e neoplasia mieloproliferativa, sem outra especificação (NNMPS) (5). TE, PV e MF são descritas como as *BCR::ABL1* negativas mais frequentes nos indivíduos acometidos por alguma NMP, as quais podem ser diferenciadas por sinais, sintomas, alterações laboratoriais e clínicas e os achados genéticos (1).

Com avanços nos estudos moleculares, passou-se a compreender melhor as vias de sinalização e achados genéticos envolvidos nas neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas, o que forneceu, e ainda fornece, informações mais precisas para o diagnóstico dessas neoplasias hematológicas. Entre as várias vias moleculares investigadas, destaca-se a JAK/STAT, relacionada às NMPs, que tem sido objeto de estudo mais aprofundado. Nesse contexto, o gene *Janus quinase 2 (JAK2)*, localizado nos cromossomos 9p24.1, assumiu papel de destaque, por codificar a proteína Janus quinase (6). Essa tirosina quinase é fundamental para a sinalização de citocinas e fatores de crescimento hematopoiéticos na via JAK/ STAT (7). Dessa forma, variantes genéticas que levam a modificações estruturais em nível de proteína podem desregular ou alterar o processo de sinalização de vias hematológicas, tornando o *JAK2* um biomarcador de interesse (8).

Em 2005, três grupos de pesquisa independentes identificaram uma mudança entre guanina (G) e timina (T) no nucleotídeo 1849 do éxon 14 de *JAK2*: a *JAK2V617F* (9,10). Classificada como uma variante *missense*, essa alteração genética causa uma substituição entre valina e fenilalanina no códon 617 da cadeia polipeptídica de *JAK2*, o que altera seu domínio regulatório e leva a ativação constitutiva da mesma, e, conseqüentemente, da via JAK/STAT (6). O resultado é uma produção desregulada de células mieloides (eritrócitos, megacariócitos

e granulócitos), aspecto observado em pacientes com NMPs *BCR::ABL1* negativas (11). Essa alteração genética tornou-se um biomarcador de interesse, identificada em torno de 90% dos casos de policitemia vera e entre 50% e 60 % dos casos de trombocitemia essencial e mielofibrose (4,12–14). Mesmo com protagonismo etiopatogênico nas NMPs, *JAK2V617F* não é uma variante germinativa, o que condicionou diversas hipóteses sobre os eventos que antecedem a aquisição dessa alteração genética.

Pesquisadores demonstraram uma associação entre *JAK2V617F* e o haplótipo 46/1, um conjunto de variantes da linha germinativa do gene *JAK2* marcado pelas variantes rs3780367 (G), *rs10974944* (G), rs12343867 (C) e rs1159782 (C)(15,16). Estudos demonstraram que essas alterações genéticas favorecem o aparecimento de *JAK2V617F* (4,15,17,18) por aumentar a taxa mutacional de *JAK2*, o que pode levar a danos no DNA e erros de replicação (19). Com isso, variantes que conferem uma vantagem seletiva, como é o caso de *JAK2V617F*, são adquiridas e causam o distúrbio mieloproliferativo clonal (20).

Além de ser identificado em pacientes NMPs de diversas populações, esse haplótipo também foi associado a alterações laboratoriais mais acentuadas, presença de esplenomegalia, desregulação inflamatória, casos familiares de NMPs (elevando o risco de desenvolver alguma neoplasia mieloproliferativa em 5 a 7 vezes) e metilação anormal do promotor gênico (21,22).

A região promotora também pode auxiliar em uma melhor compreensão sobre a desregulação do gene *JAK2* nas NMPs. Um estudo identificou uma atividade transcricional aumentada em células com a variante *rs1887428* (G), sugerindo que a ligação aumentada do fator de transcrição em *rs1887428* pode levar ao aumento da expressão de *JAK2* e conferir uma vantagem seletiva em células com essa variante (23).

A variante *JAK2V617F* é um marcador molecular de elevada importância para o diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas, todavia, outros mecanismos envolvidos nessas doenças ainda permanecem pouco conhecidos. O haplótipo 46/1, em DL com *rs10974944*, demonstrou-se associado à *JAK2V617F* em populações do continente europeu, asiático e em indivíduos dos Estados Unidos da América. Dados sobre a população brasileira concentram-se apenas entre indivíduos de estados do sudeste, ao passo que os dados sobre a população Amazônica ainda são desconhecidos. Informações sobre a região promotora nessas populações são ausentes, o que denota uma lacuna na investigação do contexto molecular das NMPs.

O desenvolvimento do presente projeto visa contribuir para uma melhor compreensão dos fatores genéticos e moleculares envolvidos nas NMPs, permitindo a melhora de testes diagnósticos para a detecção mais específica destas patologias, bem como a possibilidade de

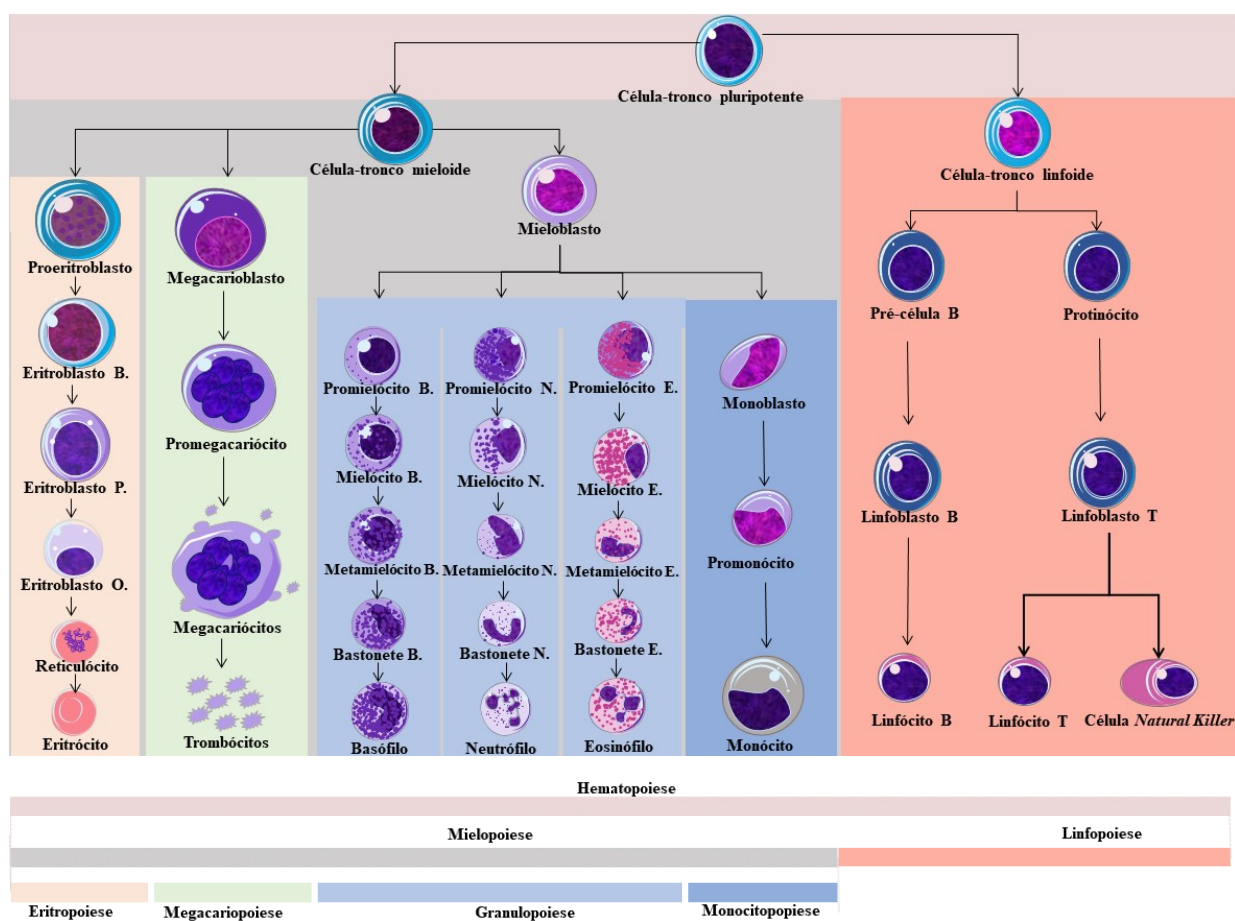
identificação de fatores de risco de pré-disposição e hereditários, vislumbrando o desenvolvimento de testes preditivos no futuro para familiares de pessoas com diagnóstico para essas patologias. A pesquisa também contribui com a investigação do perfil genético dos pacientes NMPs atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), visando proporcionar benefícios para a propedêutica e terapêutica dos pacientes atendidos na fundação.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Hematopoiese

A hematopoiese, do grego “*haîme*” (sangue) e “*poiesis*” (criar/fazer), consiste em um conjunto de eventos celulares, metabólicos e genéticos responsáveis pela produção, diferenciação e maturação das células que compõem o sangue e o sistema imunológico (24,25) (Figura 1). Por meio deste processo, são geradas cerca de 500 bilhões de células hematopoiéticas a cada dia, as quais exercem funções relacionadas ao transporte de nutrientes e oxigênio, ação imunológica e hemostasia (26,27).

Esses elementos celulares são originados a partir de células-tronco hematopoiéticas (CTH), as quais possuem capacidade de diferenciação em progenitores de todas as linhagens, alta capacidade proliferativa e autorrenovação para manutenção do *pool* hematopoiético imaturo e indiferenciado (24,28,29).



**Figura 1:** Modelo clássico de hematopoiese e seus subprocessos: Mielopoiese (que engloba as etapas de eritropoiese, megacariopoiese, granulopoiese e monocitopoiese) e Linfopoiese. Legenda: P - policromático; O - ortocromático; B - basófilo; N - Neutrófilo; E - eosinófilo.

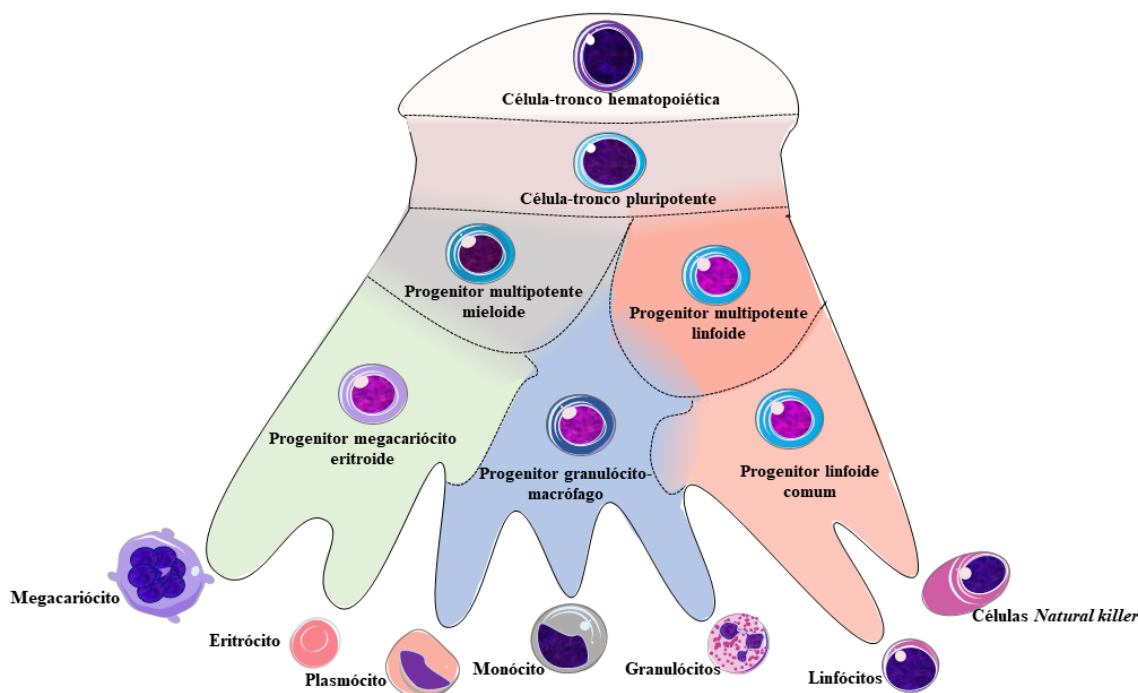
Fonte: Liggett e Sankaran (2020) – adaptado.



De acordo com o modelo clássico de diferenciação de células sanguíneas, as células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, localizadas na medula-óssea (em indivíduos adultos), passam por uma sequência de eventos mediados por reguladores do microambiente medular (interações célula-célula ou secreção de citocinas) que são essenciais para o processo de sobrevivência, proliferação, maturação e ativação funcional (24,30).

Consequente a estes eventos, estas células diferenciam-se em células-tronco multipotentes de duas linhagens (27): a linfoide, que passam pelo processo de proliferação e diferenciação para originar os linfócitos B, T e células *Natural killer*; e a mieloide que se prolifera e diferencia-se em granulócitos (basófilos, neutrófilos e eosinófilos), monócitos, eritrócitos e megacariócitos(28), como pode ser observado na figura acima.

Após diversas descobertas, foi proposto um novo modelo, demonstrado na Figura 2, para representação da hematopoiese. O modelo baseia-se em descobertas recentes obtidas por meio de estudos em transcriptômica, os quais demonstraram que a diferenciação e maturação da linhagem hematopoiética ocorre de forma contínua em vez de em estágios pontuados, como sugere o modelo clássico (31).



**Figura 2:** Modelo atual da hematopoiese, baseado em proliferação contínua dos elementos sanguíneos.  
**Fonte:** Bao, Cheng, Sankaran, 2019 (31) – adaptado.

Independente do modelo estudado, é sabido que todo este processo hematopoiético é finamente regulado e dependente de uma orquestração coordenada e recepção de sinais extrínsecos envolvendo diversas vias de sinalização relacionada a fatores de transcrição (TF)

que medeiam a expressão de genes hematopoiéticos (32). Logo, alterações em genes hematopoiéticos, fatores de transcrição ou vias de sinalização da hematopoiese (33) podem levar alterações patológicas, incluindo neoplasias hematológicas e, dentro deste grupo, encontram-se as neoplasias mieloproliferativas.

## **2.2. Neoplasias mieloproliferativas**

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) consistem em um grupo de malignidades hematológicas clonais caracterizadas por hiperplasia e excesso de um ou mais elementos da linhagem mieloide devido ao acometimento das células-tronco hematopoiética (3,4,31). Essas patologias compartilham variações genéticas (substituições, inserções, deleções ou translocações) que ativam constitutivamente as vias fisiológicas de transdução de sinal responsáveis pela hematopoiese, levando ao aumento na proliferação mieloide, sem prejuízo na maturação e diferenciação celular e culminando no aumento da massa referente aos eritrócitos, elevação dos leucócitos no sangue periférico (leucocitose) e trombocitose (3,4,31,34).

Com incidência de 6 casos a cada 100.000 indivíduos, estas patologias atingem principalmente indivíduos entre a sexta e a sétima década de vida, do sexo masculino, caucasianos (3,4,34). Seus sinais, sintomas, achados genéticos, diagnóstico e tratamento hoje em dia são bem elucidados, mas até chegar a estes parâmetros e conceitos, uma longa caminhada de descobertas científicas foi traçada.

### **2.2.1. Histórico das neoplasias mieloproliferativas**

O processo de descobertas das NMP iniciara entre 1845 e 1880, quando David Craigie (1793-1866), John Bennett (1812-1875) e Rudolph Virchow (1821-1902) descreveram os primeiros casos de Leucemia Mieloide Crônica (LMC) como “hipertrofia do baço e do fígado em que a morte ocorreu por supuração sanguínea” (35–37). Considerando estas descobertas e os conhecimentos hematológicos da época, Franz Ernst Christian Neumann (1834-1918) propôs, em 1868, que a “medula óssea é um importante órgão para a formação do sangue [...], atuando continuamente na formação de novo dos glóbulos vermelhos” (38).

Neumman também propôs a hipótese de que a medula abrigava células-tronco responsáveis pela produção dos elementos sanguíneos. Vários estudiosos da época debruçaram-se a investigar melhor as proposições estabelecidas por Neumman, e dentre eles estava Paul Ehrlich que, em 1880, classificou as leucemias de acordo com a linhagem acometida, dividindo-as em leucemias mieloides e linfoides (35).

Em 1879, Gustav Heuck (1854-1940) descreveu os dois primeiros casos de mielofibrose (MF) em dois jovens, descrevendo como principais traços característicos a presença de leucócitos anormais, esplenomegalia e blastos circulantes (35,39). Treze anos depois, em 1892, o médico francês Louis Henri Vaquez (1860-1936) foi o primeiro a descrever uma patologia hematológica caracterizada por aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia), taquicardia, cianose e eritropoiese aumentada, pontos também notados por Willian Osler (1849-1919) em alguns de seus pacientes (10,40).

Osler, em 1903, realizou uma revisão descritiva de seus pacientes com estas características, associando com casos similares já citados na literatura da época, descrevendo-os de forma mais minuciosa, o que levou a nomeá-la por “policitemia com cianose”, atualizada anos depois pela nomenclatura de “policitemia vera” (PV) (35). Outra descoberta foi a da trombocitemia essencial (TE), descrita em 1934 por Emil Epstein (1875–1951) e Alfred Goedel como uma doença hemorrágica com trombocitose evidente (35).

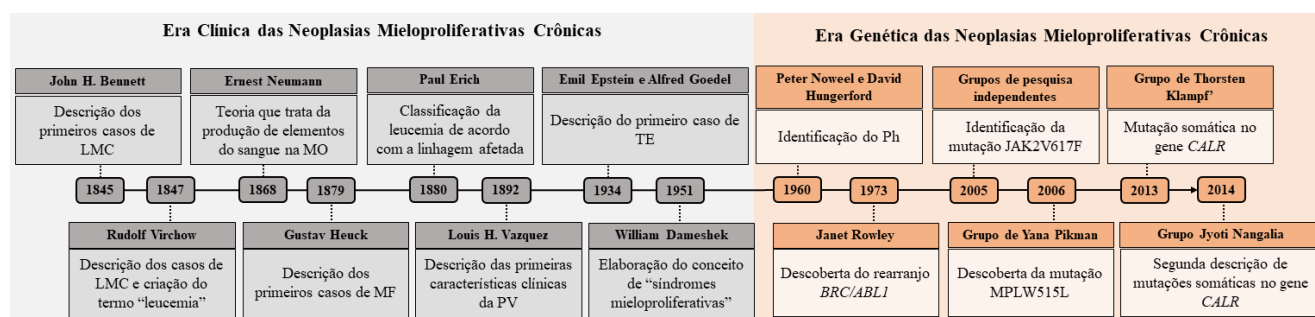
Partindo das informações disponíveis na literatura da época, William Dameshek (1900-1969) percebeu similaridades entre LMC, PV, MF e TE, descrevendo-as como “patologias correlacionadas” devido a alterações na medula óssea desencadeadas ainda não identificadas (10,35). Foi neste momento que surgiu o conceito de “síndromes mieloproliferativas” proposto por ele no ano de 1951 (10). Além da abordagem clínica estabelecida na época, Dameshek já considerava a possível relação dos fatores genéticos no desencadeamento dessas neoplasias, pensamento também compartilhado por outros estudiosos, o que fomentou ainda mais a genética como um dos focos para a elucidação das NMPs (10,41,42).

O evento que solidificou a genética como uma das principais aliadas no diagnóstico das NMPs foi também a primeira associação entre uma anormalidade cromossômica e uma doença oncológica descrita na história da Medicina (43). Em 1960, Peter Noweel (1928-2016) e David Hungerford (1927-1993) identificaram o “cromossomo Filadélfia (Ph)”, alteração cromossômica presente em grande parte dos pacientes com LMC (44–47). Em 1973, Janet Rowley (1925-2013) analisou esta alteração com o uso da técnica de fluorescência de quinacrina, na qual observou que o cromossomo Ph, translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, origina o *BCR-ABL1*, um gene híbrido que codifica uma proteína de 210 kDa (quilodaltons) com atividade de tirosina quinase, a qual acomete o crescimento e diferenciação celular de células hematopoiéticas na LMC (35,44,46–50).

Duas décadas depois a genética voltou a impactar nos conceitos relacionados à patogênese das NMP. Em 2005, diversos grupos independentes publicaram estudos descrevendo uma variante genética relacionada ao desenvolvimento destas patologias: a

*JAK2V617F*, encontrada em 95% dos pacientes com PV e em 50-60% dos pacientes com TE e MF (4,12,49). Assim como o rearranjo *BCR::ABL1*, *JAK2V617F* revolucionou o diagnóstico e tratamento das NMP, tornando-se um dos critérios mais específicos no diagnóstico das NMP(4). Outras descobertas envolve a descoberta da variante MPLW515L e variações somáticas no gene *CALR* (gene da calreticulina) (51).

Todos estes eventos, resumidos na Figura 3, podem ser divididos em duas eras distintas: Era clínica das Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas e Era Genética das Neoplasias Mieloproliferativas crônicas, as quais foram de extrema importância para os conhecimentos relacionados a NMPs e seu diagnóstico.



**Figura 3:** Principais marcos históricos envolvendo as descobertas relacionadas as NMPs. Legenda: LMC: leucemia mieloide crônica; MO: medula óssea; MF: mielofibrose; PV: Policitemia vera; TE: trombocitemia essencial; Ph: Filadélfia.

**Fonte:** Torres et al., 2022(51) - adaptado.

## 2.2.2. Caracterização das Neoplasias mieloproliferativas

De acordo com as determinações estabelecidas pela OMS na última edição do “*WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*”, de 2022, as Neoplasias Mieloproliferativas incluem as seguintes malignidades hematológicas: LMC positiva para o rearranjo *BCR-ABL1*, PV, TE, MF, leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), leucemia eosinofílica crônica (LEC), leucemia neutrofílica crônica (LNC), e neoplasia mieloproliferativa não especificada (NNMPS) (5). Desse grupo, PV, TE e MF são as mais frequentes entre as NMPs *BCR::ABL1* negativo (4) e a suas distinções são baseadas na integração de achados do sangue periférico, dados genéticos e moleculares e avaliação de biópsia da medula óssea, uma vez que nenhum desses parâmetros isolados fornece um diagnóstico fidedigno (5).

### 2.2.2.1. Policitemia vera (PV)

A PV é uma neoplasia hematológica indolente, caracterizada por proliferação exacerbada dos elementos da série eritroide e aumento na contagem dos granulócitos e trombócitos, em alguns casos (11). De acordo com a OMS, dois estágios clínicos da PV são

reconhecidos: um policitêmico, associado com nível elevado de hemoglobina, hematócrito elevado e aumento da massa eritrocitária, e um de mielofibrose pós-policitêmica, caracterizado por citopenias associadas a hematopoiese ineficaz, fibrose da medula óssea, hematopoiese extramedular e hiperesplenismo, sendo o último estágio uma forma grave e com prognóstico pouco favorável (4,52).

Dentre as *BCR::ABL1* negativas (também chamadas de NMP clássicas), a PV é a mais frequente, apresentando uma incidência de 0,5 – 4,0 casos a cada 100.000 em indivíduos australianos, europeus, coreanos, neozelandeses e norte-americanos com idade entre 60 e 65 anos (4,36,53–55). No Brasil, a epidemiologia da PV não é bem elucidada em virtude dos escassos estudos envolvendo esta neoplasia. Entretanto, um estudo realizado em 2018 avaliou casos de NMPs em Santa Catarina e constatou uma incidência 0,35 casos a cada 100.000 indivíduos, sendo a maioria sexo feminino com idade média de 67 anos (56).

#### 2.2.2.1.1. Critérios de diagnóstico

Os critérios que norteiam o diagnóstico da PV são descritos pela OMS, a qual estabelece o diagnóstico por meio da implementação de parâmetros maiores e menores (Quadro 1). Tem-se o diagnóstico conclusivo quando o paciente apresenta 3 critérios maiores ou 2 critérios maiores e um menor. O critério relacionado ao aumento de 25% massa eritrocitária, ainda presente na classificação de 2016 (4), foi removido da nova edição devido a sua escassa aplicação na prática clínica de rotina, o que justificou sua remoção como critério diagnóstico (5).

**Quadro 1:** Critérios de diagnósticos para policitemia vera (OMS, 2022)

| CRITÉRIOS MAIORES |   |
|-------------------|---|
| 1                 | Hemoglobina de > 16,5 g/dL ou hematócrito de > 49% para homens; e hemoglobina de > 16,0 g/dL ou hematócrito de > 48%  |
| 2                 | Presença de Panmielose (hipercelularidade ajustada à idade com crescimento das três linhagens mieloides – eritrócitos, granulócitos, megacariócitos) em biópsia da medula óssea |
| 3                 | Presença da variante NM_004972: <i>JAK2V617F</i> ou variantes no éxon 12 do gene <i>JAK2</i>  |
| CRITÉRIO MENOR    |   |
| 1                 | Nível sérico de Eritropoietina abaixo da normalidade  |

#### 2.2.2.2. Trombocitemia essencial

A trombocitemia essencial (TE) caracteriza-se pelo elevado número de plaquetas no sangue periférico (> 450 x 10<sup>9</sup>/L), causado por hiperplasia megacariocítica na medula óssea,

com alteração de outros setores medulares (eritrocítico ou granulocítico) de forma qualitativa ou quantitativa (4,11,44). Assim como na PV, a TE possui grande risco de causar eventos hemorrágicos e trombóticos, pode evoluir para Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e, em raros casos, para mielodisplasias (52,57). Ainda não existem marcadores biológicos ou genéticos específicos para TE e a presença de trombocitose isolada não é parâmetro conclusivo para diagnóstico, fazendo-se necessário a investigação sobre a origem da plaquetose a fim de descartar outras NMPs (4).

Esta patologia acomete indivíduos entre a quinta e a sexta década de vida, com uma leve prevalência entre mulheres, sendo rara em crianças (58). Segundo a OMS, os dados epidemiológicos da TE não são totalmente conhecidos e grande parte baseia-se em estudos realizados por instituições de pesquisa. Dados do Programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais dos Estados Unidos da América apontam a incidência de 2001 a 2016 como sendo de 1,14 casos a cada 100.000 habitantes (55).

Essa incidência se distribui de forma díspar entre a população norte-americana, onde indivíduos negros são mais acometidos por TE do que outros grupos étnicos (59). Na República da Coreia os dados são diferentes, havendo uma incidência estimada em 2,4 casos a cada 100.000 habitantes; na Nova Zelândia, a incidência é a de 0,99 casos a cada 100.000 habitantes (55).

Há poucos estudos epidemiológicos sobre TE em território brasileiro, todavia, uma pesquisa realizada na Unidade de Alta Complexidade Oncológica do Hospital São José, no município de Criciúma, Santa Catarina, descreveu esta patologia como a de maior incidência entre as NMPs, com 0,7 casos a cada 100.000 habitantes ao ano, a maioria mulheres com idade média de 57 anos (56).

#### **2.2.2.2.1. Critérios de diagnóstico**

Para que um paciente seja diagnosticado com TE faz-se necessário o cumprimento de três critérios maiores ou dois critérios maiores e um menor, como estabelecido pela OMS (4,60). Esses critérios levam em consideração a avaliação qualitativa e quantitativa da linhagem megacariocítica, presença de trombocitose e identificação de variantes genéticas associadas a presença da patologia, como descrito no Quadro 2. Ressalta-se que esses critérios não foram alterados na nova classificação da OMS por estarem bem estabelecidos na prática clínica (5).

**Quadro 2:** Critérios de diagnósticos para trombocitemia essencial (OMS, 2022)

| CRITÉRIOS MAIORES |  |
|-------------------|--|
| 1                 | Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$   |
| 2                 | Biópsia de medula óssea demonstrando hiperplasia megacariocítica, com megacariócitos maduros, hiperlobulados, raro desvio a esquerda para neutropoiese ou eritropoiese |
| 3                 | Ausência de critérios para PV, MF, LMC ou outra NMP  |
| 4                 | Presença de mutações em <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou <i>CALR</i>  |
| CRITÉRIO MENOR    |  |
| 1                 | Presença de algum marcador clonal ou ausência de trombocitose reativa  |

### 2.2.2.3. Mielofibrose

A mielofibrose (MF) origina-se a partir de processos diretamente advindos da desregulação da hematopoiese (Mielofibrose Primária) ou por evolução de outras patologias hematológicas como TE ou PV (Mielofibrose secundária). A mielofibrose (MF) é a NMP que possui o pior prognóstico, caracterizada pela proliferação de megacariócitos predominantemente anormais e granulócitos na medula óssea, que na doença totalmente desenvolvida está associada a deposição reativa de fibras de colágeno e hematopoiese extramedular (4,11,57). Essa patologia apresenta dois estágios: um pré-fibrótico (medula óssea hiperclular com ausência ou fibrose de reticulina mínima) e um fibrótico (reticulina marcada ou fibrose de colágeno na medula óssea e, frequentemente, osteosclerose) (4).

A MF acomete homens e mulheres entre a sexta e a sétima década de vida (4) e apresenta uma incidência de 0,33 casos a cada 100.000 indivíduos ao ano na América do Norte (55); 0,4 casos a cada 100.000 na República da Coreia (54); e 0,88 casos a cada 100.000 indivíduos na Nova Zelândia (55). No Brasil, um dos poucos dados epidemiológicos são advindos de um estudo realizado no estado de Santa Catarina, onde a incidência de casos de MF foi de 0,23 casos por 100.000 indivíduos ao ano com idade média de diagnóstico de 66,71 anos (56).

#### 2.2.2.3.1. Critérios de diagnóstico

Os critérios de diagnóstico para MF estabelecidos pela OMS são categorizados de acordo com a fase pré-fibrótica e a fase fibrótica da MF (4,5) (Quadro 3). Para o diagnóstico da MF pré-fibrótica é necessário que sejam atendidos todos os critérios maiores e no mínimo um critério menor confirmado duas vezes.

**Quadro 3:** Critérios de diagnósticos para mielofibrose primária (OMS, 2022)(4,5)

| CRITÉRIOS MAIORES |  |
|-------------------|--|
| 1                 | Proliferação megacariocítica exacerbada e atípica sem fibrose medular de reticulina; medula hiper celular, aumento da granulopoiese e diminuição da eritropoiese       |
| 2                 | Ausência de critérios de diagnóstico para LMC, PV, TE, síndromes mielodisplásicas e outras neoplasias mieloides  |
| 3                 | Presença de mutações no gene <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> ; presença de outro marcador clonal; ausência de fibrose reticulina da medula óssea reativa menor |
| CRITÉRIOS MENORES |  |
| 1                 | Anemia   |
| 2                 | Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$  |
| 3                 | Esplenomegalia palpável  |
| 4                 | Nível de lactato desidrogenase acima do valor de referência  |

Para o diagnóstico de MF fibrótica é necessário o cumprimento de 3 critérios maiores e um critério menor, o qual deve ser confirmado duas vezes (4) (Quadro 4). Os critérios são bem similares ao de MF pré-fibrótica, destacando-se como maior diferencial a presença de reticulina e fibras de colágeno detectada através do exame de biópsia de medula óssea e a leucoeritroblastose, as quais são característicos da fase fibrótica.

**Quadro 4:** Critérios de diagnósticos para mielofibrose primária fibrótica (OMS, 2022)

| CRITÉRIOS MAIORES |   |
|-------------------|---|
| 1                 | Proliferação megacariocítica exacerbada acompanhada por reticulina e/ou fibrose de colágeno   |
| 2                 | Ausência de critérios de diagnóstico para LMC, PV, TE, síndromes mielodisplásicas e outras neoplasias mieloides   |
| 3                 | Presença de variantes no gene <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> ; presença de outro marcador clonal; ausência de fibrose reticulina da medula óssea reativa menor |
| CRITÉRIOS MENORES |   |
| 1                 | Anemia  |
| 2                 | Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$   |
| 3                 | Esplenomegalia palpável   |
| 4                 | Nível de lactato desidrogenase acima do valor de referência   |
| 5                 | Leucoeritroblastose   |

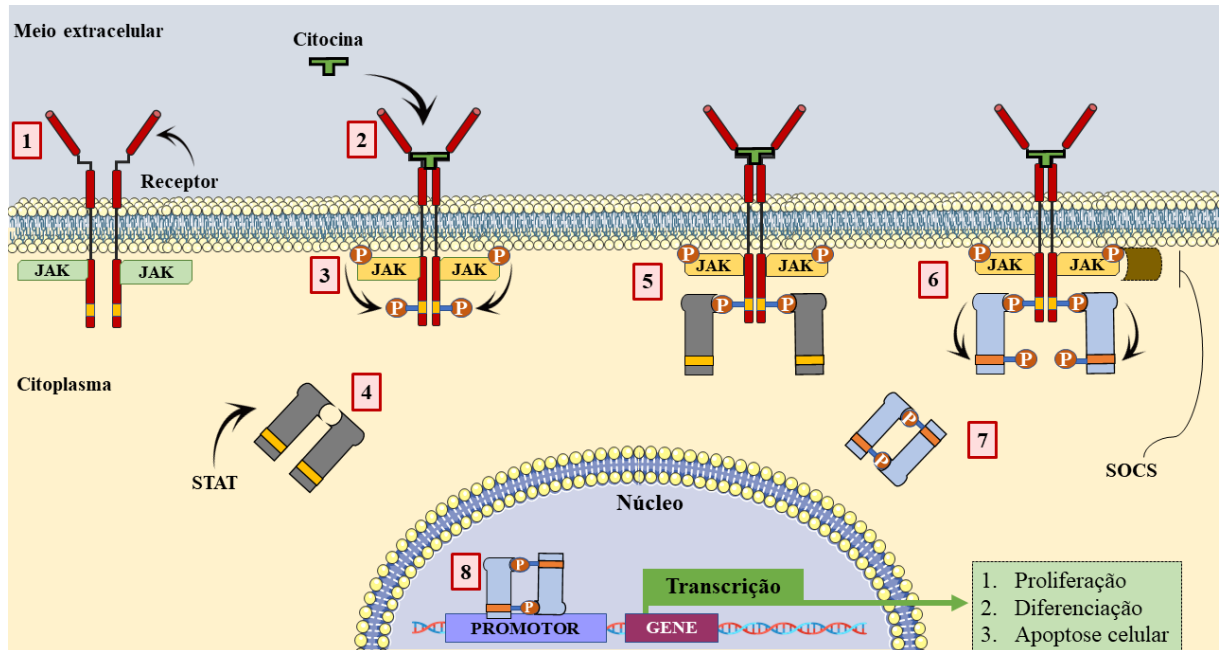
Como pode-se observar, tanto na MF quanto em PV e TE, os achados genéticos são ferramentas úteis ao diagnóstico das NMPs (4). Essas variantes são características destas patologias e assumem papel importante no processo de desregulação da via de sinalização dessas patologias.

### 2.2.3. Via de sinalização das neoplasias mieloproliferativas

Os conhecimentos acerca dos mecanismos pelos quais um sinal extracelular pode modificar a biologia de uma célula, ativando o processo de transcrição, foi bastante estudado e



levou a uma melhor compreensão sobre os conceitos envolvidos na sinalização do receptor de citocinas e suas funções nas doenças hematopoiéticas (61). Uma dessas vias de interesse é a JAK-STAT (Figura 4), a qual possui papel central na sinalização de citocinas a partir da regulação da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, resposta imune e oncogênese (61,62).



**Figura 4:** Processo de sinalização da via JAK/STAT. O receptor [1], após a ligação de citocinas [2], sofre mudanças em sua conformação, que ativam os JAKs (Janus quinase) ligados ao receptor [3], que, por sua vez fosforilam os receptores, posteriormente usados como um local de *docking* para as moléculas STATs (transdutor de sinal dos fatores de transcrição e ativador da transcrição) [4, 5]. STATs são fosforiladas pelas JAKs [6], que induzem sua homodimerização ou heterodimerização [7] e subsequente tráfego para o núcleo [8] onde regulam a transcrição de genes relacionados a proliferação, diferenciação e apoptose celular. A atividade da via JAK2-STAT é regulada negativamente por SOCS1 (supressor de sinalização de citocinas tipo 1)(61).  
**Fonte:** Paes (2023).

A via JAK-STAT pode ser definida como uma cascata de sinalização simples, na qual a citocina requer apenas três componentes (receptor, quinase e fator de transcrição) para iniciar uma resposta (62). Essa via começa pela ligação de uma citocina ao seu receptor cognato (eritropoietina, trombopoietina, receptor de fator estimulador de colônia de granulócitos, interleucina 3 e 5), ativando-o (54,61,63). Em seguida, JAK2 é ativada e promove o recrutamento para o complexo receptor do transdutor de sinal dos fatores de transcrição e ativador da transcrição (STAT) 3 e STAT que, por sua vez, são fosforiladas pelas JAKs, que induzem sua homodimerização ou heterodimerização e subsequente tráfego para o núcleo onde regulam a transcrição de seus genes alvo (57,63). Uma vez no núcleo, as moléculas STATs ligam-se a sequências promotoras de DNA específicas que resultam na transcrição de genes que regulam os processos de proliferação, diferenciação e apoptose celular (54,57,61,63). Além

da ativação de STAT, a sinalização de JAK ativa outras vias de sinalização, como proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), fosfatidilinositol-3'-quinase (PI3K) e AKT/alvo de rapamicina de mamífero (mTOR) (61).

A regulação negativa da via JAK-STAT é mediada por supressor de sinalização de citocinas tipo 1 (SOCS1) e proteína adaptadora de linfócitos (LNK), as quais agem como inibidores da via (63). O SOCS1 atua negativamente através da inibição da atividade da quinase JAK2 competindo com os domínios SH2 STATs por sítios de ligação no domínio citoplasmático do receptor ou por meio da degradação proteassomal de proteínas de sinalização por ligação ao domínio JH1 de JAK2, inibindo a ativação de todas as outras vias associadas a JAK-STAT (2).

Estudos atestam que o prolongamento da sinalização JAK-STAT leva ao desenvolvimento aberrante de células-tronco hematopoiéticas e doenças hematológicas malignas (10,63–65). Tal evento pode ser desencadeado pela presença de variações genéticas de ganho de função no gene *JAK2*, que codifica a proteína com o mesmo nome. Essas variantes, quando presentes, podem causar a ativação constitutiva da via, resultando em mieloproliferação e produção de citocinas, fenótipo definitivo das MNPs (63,65,66).

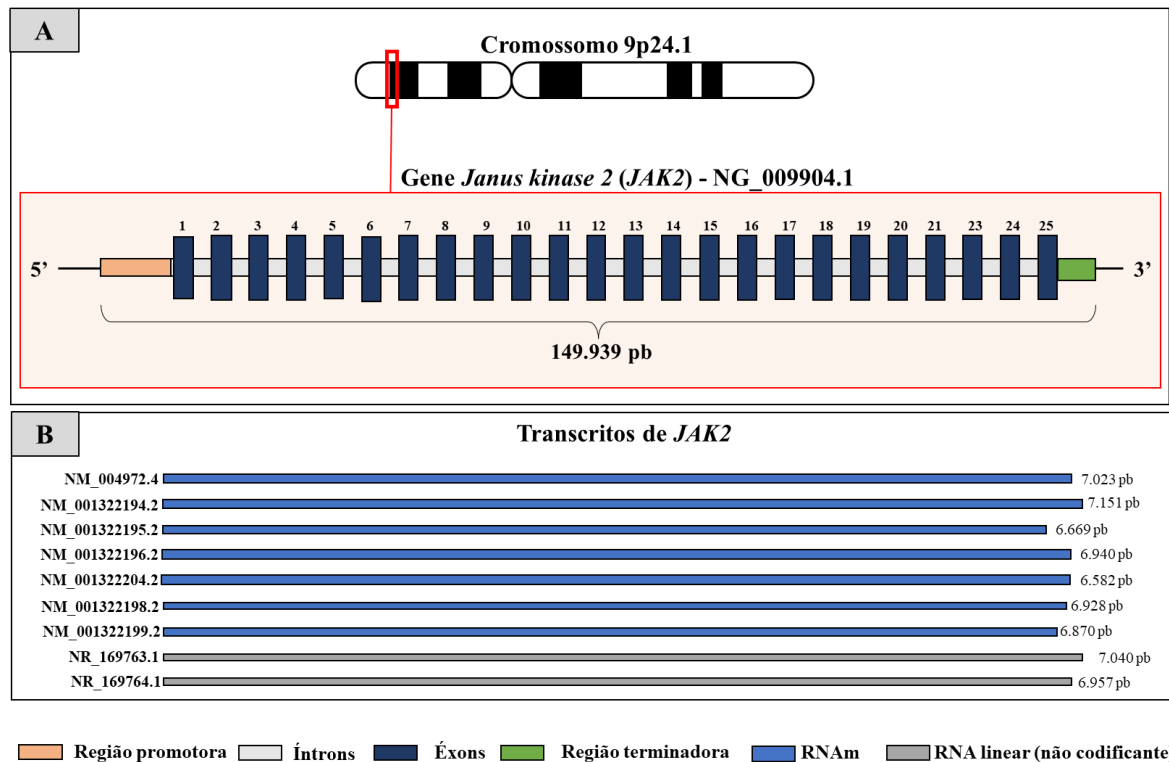
#### 2.2.4. Gene *Janus quinase (JAK2)*

O gene *Janus quinase 2*, ou simplesmente *JAK2* (RefSeq.: NG\_009904.1; ID HGNC: 6192), é um gene com 149.939 pares de bases (pb), localizado no cromossomo 9p24.1(67) (Figura 5A), possui uma região codificante com 25 éxons e 25 íntrons e sofre *splicing* alternativo.

Esse processo de excisão dos íntrons e junção dos éxons originam 7 transcritos codificantes de tamanhos que variam 6.582 e 7.151 pb (figura 5B), conforme dados do Centro Nacional para a Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*) (68). Esses, por sua vez, codificam três isoformas (A, B e C) da mesma proteína, a qual também recebe nome de Janus quinase 2 (JAK2) pelo fato de apresentar dois domínios simétricos (JH1 e JH2), de forma semelhante à figura do deus Janus, da mitologia romana (67,69,70).

As proteínas JAKs consistem em uma família de quinases citoplasmáticas não-receptoras que englobam quatro tipos proteicos em mamíferos: JAK2, que faz parte da sinalização de receptores homodiméricos, como o receptor de eritropoietina (EPOR), receptor de trombopoietina (MPL) e receptor de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSFR), usada também por alguns receptores heterodiméricos; e JAK1, JAK3 e tirosina quinase 2

(TYK2), úteis na sinalização de receptores heterodiméricos (57,63,66). Essas proteínas são relativamente grandes com cerca de 1.150 aminoácidos e com peso molecular variando entre 116-140 kDa (71). Dessas, JAK2 merece destaque devido ao seu protagonismo no mecanismo de proliferação hematopoiético, especialmente em relação às NMPs.



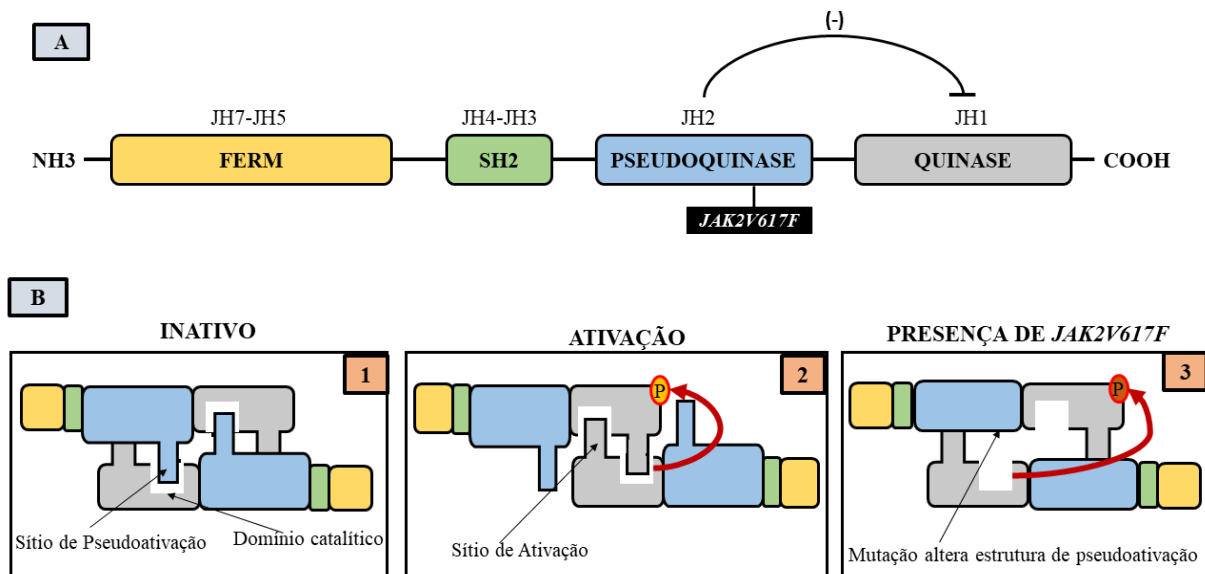
**Figura 5:** Localização, estrutura e transcritos do gene *JAK2*. Composto por 149.939 pb por onde distribuem-se 25 éxons, 25 íntrons, promotor e terminador, o gene *JAK2* localiza-se no cromossomo 9p24.1 (A) e passa pelo processo de *splicing* alternativo, onde são gerados 9 transcritos (B). Desses, apenas 7 são codificantes e o NM\_001322194.2 é estabelecido como o transcrito de referência para a proteína.

**Fonte:** Paes (2023).

*JAK2* é constituída por 4 domínios: dois domínios quinases, JH1 (tirosina quinase, cataliticamente ativo e localizado na porção C terminal) e JH2 (pseudoquinase, cataliticamente inativo), onde JH2 é responsável por inibir o domínio JH1 e promover a ativação dependente de citocinas; um domínio do tipo FERM (*4.1/ezrin/radixin/moesin*) constituído pelos domínios homólogos JH5, JH6 e JH7, localizado na porção N terminal e que é responsável pela ligação não-covalente de JAKs ao receptor de citocinas; e um domínio do tipo SH2 (Src Homologia 2) que contém os domínios homólogos JH4 e JH3 (57,72) (Figura 6).

Estudos realizados em camundongos revelam que a deleção homozigótica da linha germinativa dos alelos *JAK2* resulta em letalidade embrionária devido à eritropoiese ineficaz, visto que os progenitores hematopoiéticos deficientes em *JAK2* não respondem à estimulação

da eritropoietina (63,66), o que demonstra a importância de se conhecer mais sobre os aspectos genéticos envolvendo esta proteína, incluindo as variações genéticas que a acomete, tal como *JAK2V617F*.



**Figura 6:** Estrutura da proteína JAK2. É constituída por um domínio FERM (JH7-JH5), SH2 (JH4-JH3), pseudoquinase (JH2) e quinase (JH1), que é inibida pela porção pseudoquinase que, por sua vez, é o domínio onde localiza-se a variante *JAK2V617F* [A]. A presença de *JAK2V617F* altera a estrutura do sítio de pseudoativação [B1, B2] que se liga ao domínio catalítico da porção quinase [B3], promovendo a ativação constitutiva da proteína, desencadeando o distúrbio mieloproliferativo clonal.

**Fonte:** Chen e Mullally, 2014(73) – adaptado.

#### 2.2.4.1. *JAK2V617F*

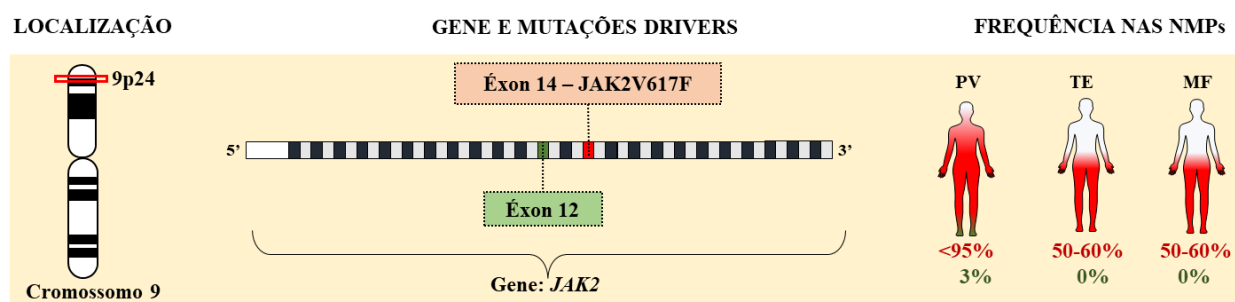
Identificada em 2005, *JAK2V617F* (ID dbSNP: *rs77375493*) é uma variante somática adquirida com ganho de função, a qual surge a partir da troca de uma guanina (G) por timina (T) no nucleotídeo 1.849 do éxon 14 de *JAK2*, que ocasiona a substituição entre valina (V) e fenilalanina (F) na posição 617 da cadeia polipeptídica, afetando o domínio JH2 da proteína (Figura 6.B2) (63,69).

Essa variante interrompe a atividade auto inibitória de JH2, levando a ativação constitutiva de JH1 e, conseqüentemente, da via JAK-STAT, interferindo na sinalização correta dos receptores de eritropoietina, fator estimulador de colônia granulócito, fator estimulador de colônia granulócito-monócito e trombopoietina. Este processo causa a transformação de células hematopoiéticas em crescimento independente de citocinas, promovendo assim a tumorigênese, progressão tumoral e inflamação causada pela estimulação contínua no interior da célula hematopoiética, fenótipo definitivo das NMPs (36,65,74,75).

Diversos estudos sugerem que a variante supracitada surge em uma célula-tronco hematopoética multipotente, a qual adquire vantagem seletiva sobre a célula hematopoética multipotente normal e promove a diferenciação mielóide, levando a um fenótipo mieloproliferativo. Desta forma, o clone mielóide anormal expande e interrompe o microambiente medular, promovendo um nicho maligno que favorece as células-tronco mutadas em relação às normais, levando à uma eventual mobilização das células maduras para o sangue periférico, o que explica a presença da variante nos leucócitos em análises genéticas (76,77). Além disso, ativação da via JAK-STAT é mais evidente em pacientes com uma alta carga de alelo variante *JAK2V617F*, demonstrando que há diferenças quantitativas na sinalização com base na presença relativa de *JAK2V617F* heterozigoto ou homozigoto (78).

Aproximadamente um terço dos casos de PV e MF positivos para *JAK2V617F* são homozigotos com cargas de variante superiores a 50%, ao passo que em TE é mais baixa (cerca de 25%) e perto de 100% em mielofibrose pós-PV ou pós-TE (54). Essa homozigose geralmente ocorre como consequência da recombinação mitótica do cromossomo 9p, que acompanha a variante e a reduz, e qualquer alelo que esteja em desequilíbrio de ligação, para um estado homozigoto (79). Esse evento é denominado Dissomia Uniparental Adquirida (DUA) ou perda neutra de heterozigosidade do número de cópias (22).

*JAK2V617F* é o evento genético mais comum nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR::ABL1* negativas, a qual é detectada em > 95% dos pacientes com PV e de 50% a 60% dos pacientes com MF e TE (3,54,78) (Figura 7). Mesmo com o grande benefício que a descoberta desta alteração genética trouxe para a terapêutica e diagnóstico das NMPs, algumas questões permanecem pouco esclarecidas, principalmente aquelas envolvendo os eventos que antecedem a aquisição da mesma, já que ela não é uma variante genética de linha germinativa (66). Este cenário começou a ser mudado a partir da descoberta do haplótipo 46/1, cujos estudos vislumbram esclarecer grande parte dessas questões.



**Figura 7:** Frequência da variante *JAK2V617F* e variantes no éxon 12 em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas *BCR::ABL1* negativas.

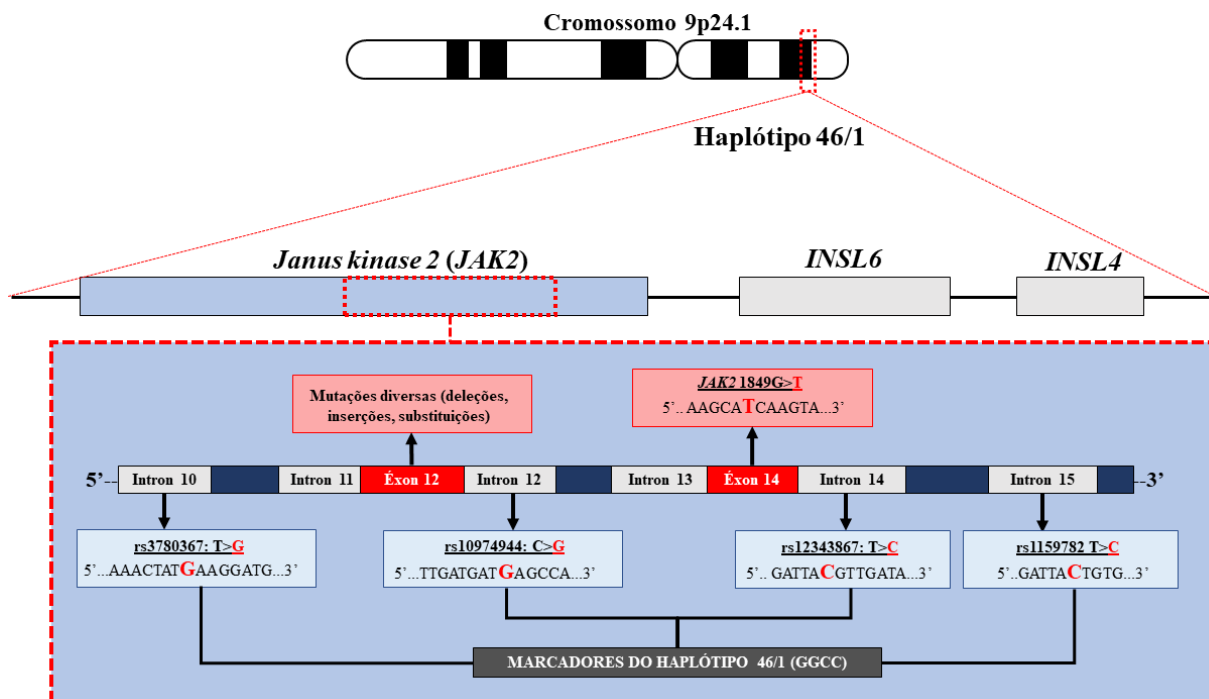
**Fonte:** Torres et al., 2022(51) - adaptado.

#### 2.2.4.2. Haplótipo 46/1

Os seres humanos são organismos diploides com duas cópias de cada cromossomo, as quais são semelhantes entre si e diferem-se apenas em uma pequena fração de informação (0,1%) (80). Essas diferenças geralmente estão contidas em sítios de alterações genéticas de base única denominadas variante de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Variant* - SNV), as quais são as variações de maior frequência no genoma humano, estimada em milhões de bases e contribuem para diferenças interindividuais hereditárias em fenótipos complexos (81). Um conjunto intimamente ligado de variações genéticas presentes no mesmo cromossomo, que não são facilmente separáveis por recombinação e, portanto, tendem a ser herdados juntos, é denominado haplótipo (82).

Os haplótipos podem ser usados para estudar a migração humana, seleção evolutiva, estrutura populacional, imputação de regiões intrônicas e melhorar o poder de associação genética entre variantes patológicas (83). Entre 2008 e 2009, uma das primeiras linhas investigativas envolvendo haplótipos e as NMPs foi relatada por três grupos de pesquisa independentes (84,85). O haplótipo 46/1 (Figura 8) foi a primeira variante de risco da linha germinativa descrita em NMP e um dos primeiros indícios de predisposição hereditária, além de ser associado a casos de esplenomegalia, trombose da veia porta e síndrome de Budd-Chiari em pacientes positivos para *JAK2V617F* (25,86–88).

O haplótipo 46/1 estende-se em um bloco com cerca de 250-280 kb localizado no cromossomo 9p.24.1. Nesta região localizam-se os genes *JAK2*, *Insulin like 6 (INSL6* – RefSeq.: NG\_046969.1; ID HGNC: 6089) e *Insulin like 4 (INSL4* – RefSeq.: NC\_000009.12; ID HGNC: 6087), sendo esses com baixa ou nenhuma expressão no sistema hematopoiético (25,77,79,89,90).



**Figura 8:** Representação do haplótipo 46/1. Esta sequência estende-se por 250-280 kb do cromossomo 9, engloba três genes (*JAK2*, *INSL6*, *INSL4*) e regiões com grande taxa de variante de *JAK2*, como o éxon 12 e éxon 14. Quatro variantes (*rs3780367*, *rs10974944*, *rs12343867* e *rs1159782*) são usadas para marcar o haplótipo e estabelecem a nomenclatura “GGCC”, como também é conhecido(91).

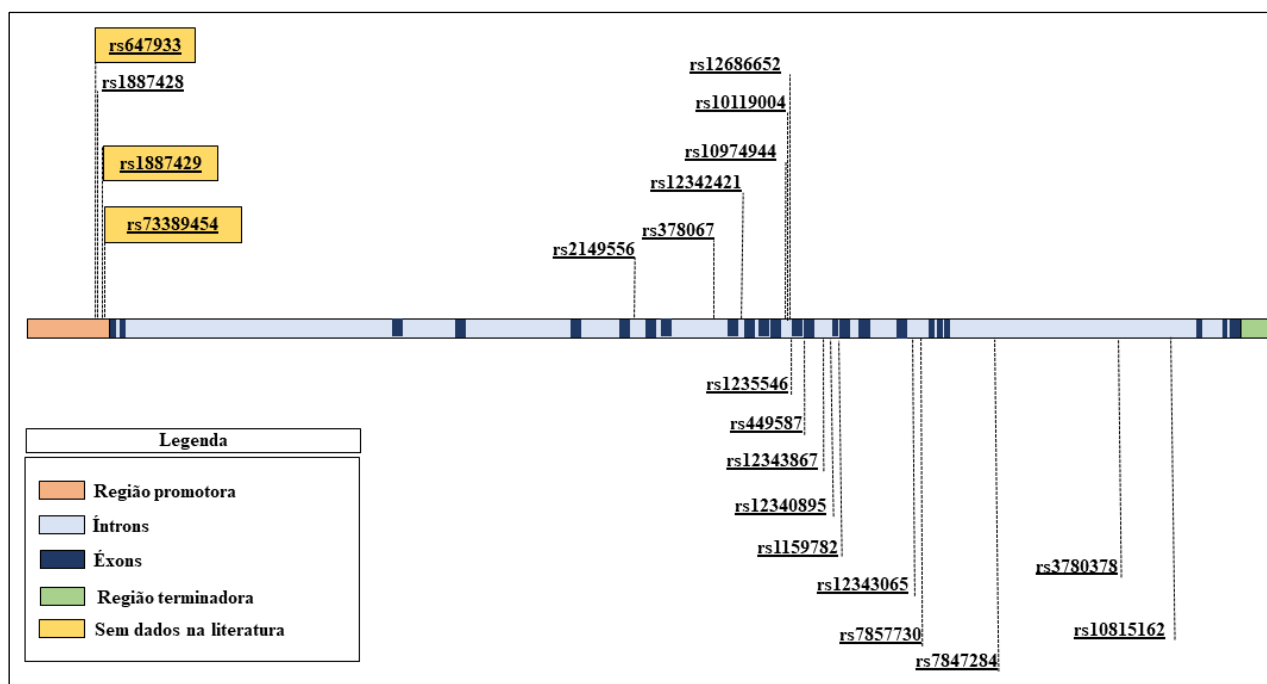
**Fonte:** Paes (2023).

Grande parte destas variantes estão em desequilíbrio de ligação (DL) estreito, uma associação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci* a qual está relacionada ao tempo dos eventos de variante, distância genética e pode fornecer informações valiosas sobre a localização de variantes de doenças a partir de marcadores genéticos (92–94).

Diversos SNVs foram estudados e sua grande maioria está demonstrado na Figura 9. Alguns deles foram usados para definir ou identificar o haplótipo 46/1, entretanto, tais alterações genéticas funcionam apenas como marcadores e as variantes causais verdadeiras ainda permanecem pouco conhecidas ou totalmente ocultas no bloco DL (79).

Quatro SNVs em DL são consideradas os marcadores mais estudados do haplótipo: *rs3780367* (NC\_000009.12:5068754:T>G; c.1327-267T>G), *rs10974944* (NC\_000009.12:g.5070831; c.1641+779C>G), *rs12343867* (NC\_000009.12:g.5074189:T>C; c.1864+404T>C) e *rs1159782* (NC\_000009.12:g.5078117:T>C; c.1993-189T>C), localizados nos íntrons 10, 12, 14 e 15, respectivamente e com o alelo de menor frequência (MAF, do inglês *Minor Allele Frequency*) (95) demonstrada na Figura 10. Entre as 4 variantes, *rs10974944* foi a primeira associada ao surgimento de NMPs (20). Estudos realizados na Europa, Japão, China, América do Norte e Brasil demonstraram que o alelo mutante (G) apresentou maior frequência

em todos os pacientes NMPs, especialmente os positivos para *JAK2V617F*, do que na população de controle (20,82,86,96–98).



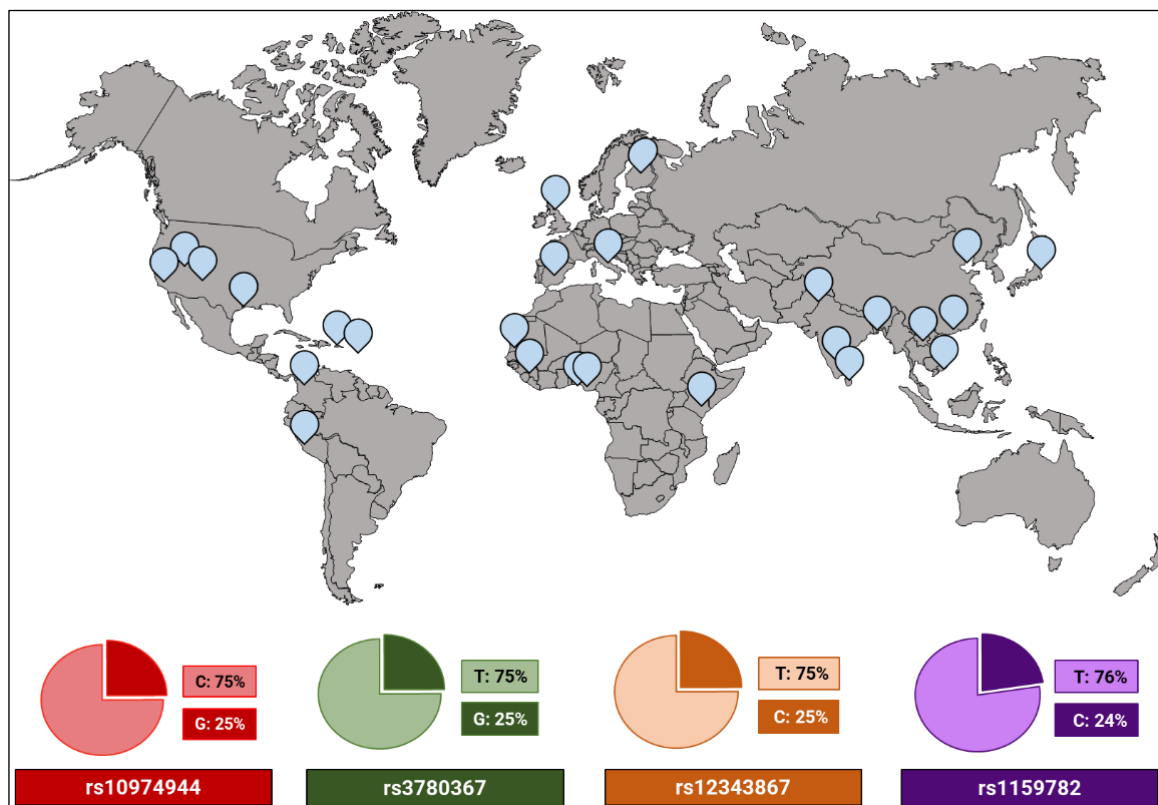
| SNV               | Referência   | Conclusões   |
|-------------------|--|--|
| <i>rs10974944</i> | (96), (86), (97), (99), (82), (20), (98), (91), (17) | Estudos realizados em populações de origem brasileira, japonesa e chinesa; resultado dos estudos demonstram que esta variante possui forte associação com pacientes NMP <i>JAK2V617F</i> positivos do que nos controles; é um alelo de risco para NMP. |
| <i>rs12686652</i> | (86)   | Significativamente maiores em pacientes com PV do que em controles, mas sem associação com NMP na população japonesa.  |
| <i>rs12335546</i> |  |  |
| <i>rs12343867</i> | (86), (97), (87), (90), (99), (98), (17)             | Associado a <i>JAK2V617F</i> positivos na população do Japão, China e Taiwan, em especial a indivíduos com PV; é usado como marcador do haplótipo, foi relatada associação com esplenomegalia e está em DL com outros SNVs do haplótipo 46/1.          |
| <i>rs4495487</i>  | (86)   | Mais frequente em PV do que em controles japoneses; não foi relatado em populações caucasianas; pode contribuir para o fenótipo NMP.   |
| <i>rs691857</i>   |  |  |
| <i>rs17803986</i> | (99)   | Sem associação significativa.  |
| <i>rs7848509</i>  |  |  |
| <i>rs10758677</i> |  |  |
| <i>rs3780367</i>  | (99), (17)   | Em desequilíbrio de ligação com outros marcadores do haplótipo; associação significativa com NMP, mas sem dados sobre população.   |
| <i>rs12340895</i> | (98)   | Associado a NMP <i>JAK2V617F</i> positivo em chineses; sobreviveu a 50.000 permutações em testes laboratoriais.  |
| <i>rs12342421</i> | (98)   | Associado à predisposição para o desenvolvimento de NMP positivo para <i>JAK2V617F</i> em 3,55 vezes para o alelo C menor (em chineses), independente do haplótipo 46/1.   |
| <i>rs1159782</i>  | (17), (91)   | Está em desequilíbrio de ligação com marcadores do haplótipo 46/1.   |
| <i>rs10119004</i> |  |  |
| <i>rs12343065</i> |  |  |
| <i>rs10815162</i> |  |  |
| <i>rs7857730</i>  | (98)   | Associados a <i>JAK2V617F</i> positivos; relatados pela primeira vez em um mesmo estudo  |
| <i>rs7847294</i>  |  |  |
| <i>rs3780378</i>  |  |  |
| <i>rs2149556</i>  |  |  |
| <i>rs2149555</i>  |  |  |



|                  |      |   |
|------------------|------|---|
| <i>rs1887428</i> | (23) | SNV de interesse. Pode alterar a taxa de expressão de <i>JAK2</i> . |
|------------------|------|---|

**Figura 9:** Localização das variantes identificadas em estudos direcionados ao haplótipo 46/1 e suas respectivas informações descritas na literatura. Variantes sem descrição na literatura foram identificadas através de análise de dados do projeto HapMap (100).

**Fonte:** Paes et al. (2022) – adaptado.



**Figura 10:** MAF dos marcadores do haplótipo 46/1. As frequências foram mensuradas a partir de amostras coletadas de indivíduos de origem mexicana residentes na Califórnia e Texas (Estados Unidos), Porto Rico, Colômbia, Peru, Gâmbia, Nigéria, Quênia, Itália, França, Reino Unido, Finlândia, Paquistão, Índia, China e Japão(95,101–105)

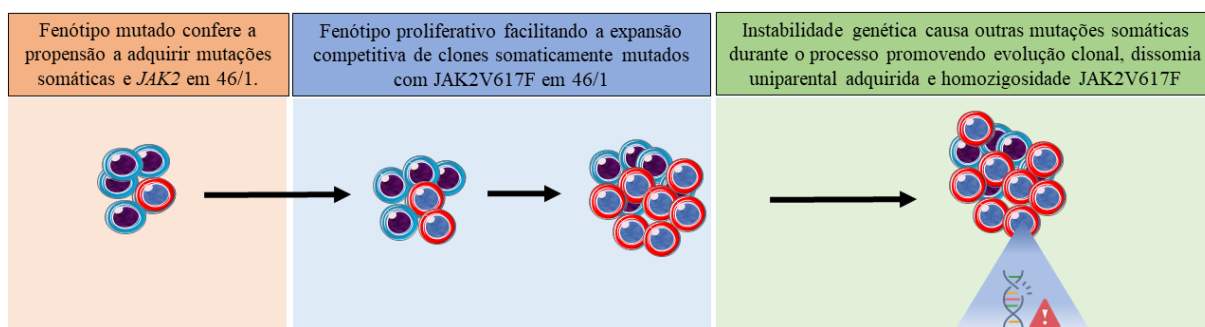
**Fonte:** Paes et al. (2022) – adaptado.

#### 2.2.4.2.1. Associação entre o haplótipo 46/1 e a variante *JAK2V617F*

A aquisição de mutações somáticas é um mecanismo patogênico de grande relevância no desenvolvimento das Neoplasias Mieloproliferativas crônicas, mas fatores genéticos antecessores a elas também desempenham papel importante no seu desenvolvimento(86). Existem duas hipóteses que explicam a associação entre o haplótipo 46/1 e a variante *JAK2V617F*: hipótese de hipermutabilidade e hipótese de solo fértil (18,109).

A “hipótese de hipermutabilidade” considera 46/1 como mais geneticamente instável, capaz de adquirir *JAK2V617F* mais rápido quando comparado a outros haplótipos (89). O suporte para esta hipótese vem da observação de que *JAK2V617F* aparentemente surgiu pelo menos duas vezes em alguns indivíduos, e possivelmente pelo fato das mutações do éxon 12 estarem associadas a 46/1, embora com um risco mais fraco (79,110). Em contrapartida, a

“hipótese de solo fértil” parte do princípio de que células-tronco hematopoiéticas portadoras do 46/1 possuem vantagem seletiva quando ocorrem mutações oncogênicas (89,97). Mesmo com proposições diferentes, uma hipótese não anula a outra e ambas podem coexistir no cenário genético dessas neoplasias (Figura 11) (82).



**Figura 11:** Ação do haplótipo 46/1 considerando a hipótese de hipermutabilidade e solo fértil em atuação mútua. **Fonte:** Jones e Cross, 2013(79) – adaptado.

Uma terceira hipótese sugerida é que o haplótipo está relacionado a uma elevada expressão de *JAK2*, *INSL6* e *INSL4*, causando recombinação de DNA, surgimento de variações genéticas ou metilação anormal da região promotora (91,111). Um estudo demonstrou que pacientes NMPs positivos apresentam uma expressão elevada de mRNA (RNA mensageiro) de *JAK2*, o que estaria relacionado a maior probabilidade de divisão das células mielóides em respostas à citocinas ativadoras da proteína, tornando-as propícias a erros de replicação (91).

A presença do haplótipo pode influenciar na aquisição de mutações somáticas em *JAK2*, bem como facilitar a expressão de *INSL6* e *INSL4* em células do estroma medular, levando a uma produção excessiva de citocinas com ação pró-inflamatória e pró-mielóide, gerando um ambiente propício para o clone mutado. De forma geral, o haplótipo pode ser descrito como um fator de suscetibilidade genética do hospedeiro para resposta mielóide inadequada a citocinas, levando a um estado inflamatório intensificado e risco aumentado de neoplasias mielóides, o qual é acelerado pela aquisição de alterações genéticas somáticas (91,111).

#### 2.2.4.2.2. O haplótipo 46/1 e hereditariedade das NMPs

O desenvolvimento de uma neoplasia hematológica é dependente de diversos fatores como o envelhecimento, ambiente e genética do hospedeiro. Os fatores genéticos herdados alteram o risco em cada fase do desenvolvimento, desde a aquisição do câncer até sua progressão (112). As formas hereditárias das NMPs podem ser divididas em duas categorias principais: (1) síndromes hereditárias que afetam uma única linhagem com herança mendeliana, alta penetrância e hematopoiese policlonal; e (2) predisposição hereditária para NMP

verdadeira, caracterizada por baixa penetrância, hematopoiese clonal, presença de mutações somáticas (por exemplo, *JAK2V617F*) e risco de progressão para leucemia mieloide aguda (112,113).

Na predisposição hereditária verdadeira, há possibilidade de ocorrência em dois ou mais membros da mesma família e, neste contexto, o termo “familiar” é usado para descrever uma alteração desconhecida da linha germinativa que predispõe a aquisição de uma NMP (112). Um estudo caso-controle, incluindo mais de 11.000 pacientes com NMP e seus quase 25.000 parentes de primeiro grau, detectou um risco de 5 a 7 vezes maior de desenvolver NMPs entre parentes de primeiro grau de pacientes com NMP (22). Outra pesquisa realizada com 72 famílias caracterizou 50% indivíduos incluídos no estudos com um padrão de herança consistente com dominância autossômica com penetrância incompleta (9).

Há evidências crescentes sugerindo os fatores hereditários como responsáveis por um efeito mais amplo sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento de NMP (79,114). Mutações somáticas vistas em NMP familiar são responsáveis pela vantagem proliferativa e posterior clonalidade celular, enquanto o componente herdado predispõe à aquisição de mutações somáticas (112,115). Neste cenário, avaliar as variantes que fazem parte do haplótipo de linha germinativa 46/1 em casos familiares torna-se pertinente para conhecer o comportamento do mesmo dentro do cenário da hereditariedade e a sua possível relação com a NMP familiar.

#### **2.2.4.3.Região promotora**

A região promotora de um gene é uma sequência de DNA localizada próxima ao início da região codificadora. Essa porção do DNA desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica, controlando a taxa de transcrição de um gene por meio de sítios de regulação, *enhancers* (interagem com fatores de transcrição para modular a atividade da RNA polimerase) e outros elementos regulatórios (116).

A identificação de alterações genéticas na região promotora tem adquirido crescente importância na prática médica, contribuindo para a compreensão dos mecanismos etiológicos de doenças complexas, sobretudo neoplasias (27,117,118). Essas alterações genéticas podem desencadear ou potencializar o surgimento de condições patológicas, ao mesmo tempo em que podem exercer um efeito protetor, por meio de processos como metilação e modulação de sítios de ligação de fatores de transcrição (119,120).

O conhecimento sobre variantes genéticas no promotor de *JAK2* e neoplasias mieloproliferativas é incipiente. Todavia, o SNV *rs1887428* (NC\_000009.12:g.4984530G>C;

MAF de C: 52%) possui associações com doença inflamatória intestinal (DII), lúpus sistêmicos, doença de Chron, colite ulcerativa e colangite esclerosante primária descritos na literatura (119,121).

Nas NMPs, *rs1887428* foi descrita como uma variante como um potencial alelo de interesse, a qual, segundo a pesquisa, está significativamente associada a NMP (23). Após ensaios laboratoriais, atestou-se uma atividade transcricional aumentada em células contendo o alelo de risco em *rs1887428*, sugerindo que a ligação aumentada do fator de transcrição em *rs1887428* pode levar ao aumento da expressão de *JAK2* e conferir uma vantagem seletiva em células contendo o haplótipo de risco(23). Logo, outros SNVs localizados próximos a ele, tais como *rs6476933* (NC\_000009.12:g.4984154C>T; MAF de T: 28%), *rs73389454* (NC\_000009.12:g.4984519A>C; MAF de C: 1,5%) e *rs1887429* (NC\_000009.12:g.4984549G>T; MAF de T: 28%) podem ser úteis em investigações envolvendo o nível de expressão do gene *JAK2* em NMPs.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Investigar a presença do haplótipo 46/1 e variantes da região promotora do gene *JAK2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativos atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM).

#### 3.2. Objetivos específicos

- Identificar as variantes do haplótipo 46/1 presentes no íntron 12 (pesquisa pelo alelo G do *rs10974944*) e região promotora (pesquisa pelo alelo T do *rs6476933*, alelo C do *rs73389454*, alelo G do *rs1887428* e alelo T do *rs1887429*) do gene *JAK2*;
- Estimar as frequências alélicas e genotípicas para as variantes do haplótipo 46/1 (íntron 12) e região promotora do gene *JAK2*;
- Investigar a associação entre haplótipo 46/1 (íntron 12), região promotora de *JAK2* e *JAK2V617F*;
- Mensurar o grau de desequilíbrio de ligação entre as variantes do íntron 12, região promotora e *JAK2V617F*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Tipo e área de estudo**

O estudo foi do tipo descritivo-correlacional transversal, desenvolvido na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM).

### **4.2. População do estudo**

A população de estudo é composta de indivíduos atendidos na FHEMOAM, recrutados no período entre julho de 2021 a julho de 2022, com diagnóstico clínico de neoplasias mieloproliferativas (NMPs) *BCR::ABL1* negativas: policitemia vera (CID45), trombocitemia essencial (CID47.3) e mielofibrose primária (CID47.4).

### **4.3. Recrutamento de pacientes**

Os pacientes foram captados do Sistema de Atendimento Médico e Estatístico (SAME) e sistema iDoctor. Após identificação, os pacientes foram contactados por meio de telefonemas, com apresentação do pesquisador seguida de uma breve conversa sobre a proposta do projeto. Em seguida, foram convidados a participar da pesquisa, onde fez-se o agendamento da coleta para o mesmo dia que os mesmos possuam consultas marcadas com o médico hematologista que faz o seu acompanhamento.

A participação desses indivíduos aconteceu mediante explicação detalhada do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 9.2), apresentação do documento de identificação do pesquisador e esclarecimento de todas as dúvidas para, em seguida, realizar a assinatura do documento, sendo uma via entregue ao participante e outra via arquivada com a equipe da pesquisa.

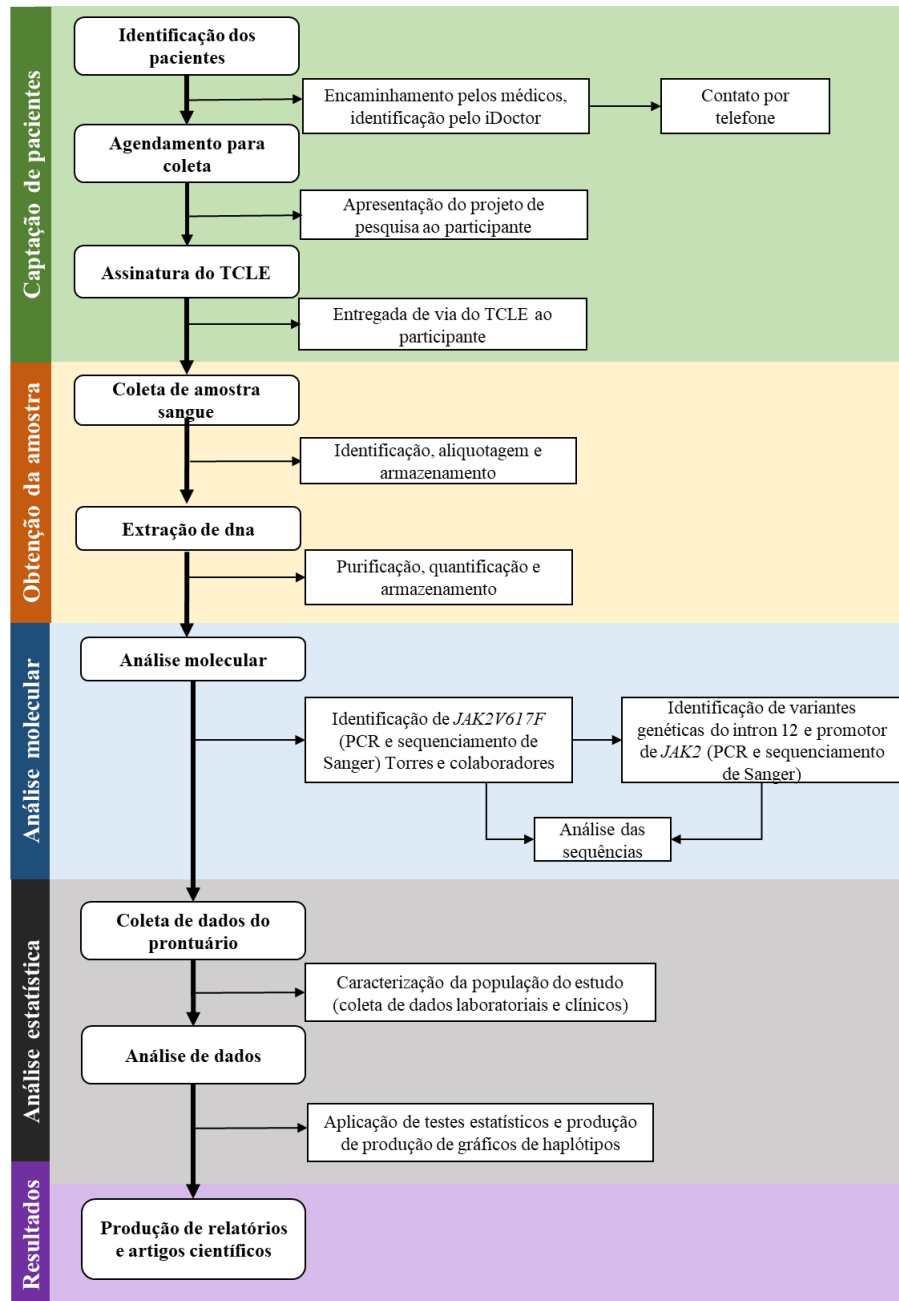
### **4.4. Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão**

Foram incluídos pacientes com diagnóstico clínico de NMPs *BCR::ABL1* negativas, ambos os sexos, com idade a partir de 18 anos com recebimento ou não de terapia citorrredutora e atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

Foram excluídos pacientes que não apresentam as informações necessárias para a caracterização clínica e laboratorial da possível NMP, pacientes com amostras de material genético de má qualidade, degradadas, ou que optaram em desistir da pesquisa, como é estabelecido no TCLE.

#### 4.5. Fluxograma de trabalho

As atividades foram divididas em diversas etapas, onde as principais estão demonstradas na Figura 12 e descritas nas sessões seguintes.



**Figura 12:** Fluxograma de atividades do projeto. Observa-se uma divisão de quatro categorias de atividades (captação de pacientes, obtenção da amostra, análise molecular e estatística) necessárias para obtenção dos resultados.

Fonte: Paes (2023).

#### 4.6. Aspectos éticos

Este estudo faz parte de um projeto principal intitulado “Caracterização molecular de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas”, o qual foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

(FHMOAM) e aprovado com o número de parecer 4.450.813 e Certificado de Apreciação Ética (CAAE) identificável pelo número 39991420.6.0000.0009 (Anexo 9.1), como estabelecido pelas normativas da Resolução N° 466 de 12 de Dezembro de 2012, a qual trata sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, e respeitando as diretrizes da Declaração de Helsinque e de Boas Práticas Clínicas (GCP).

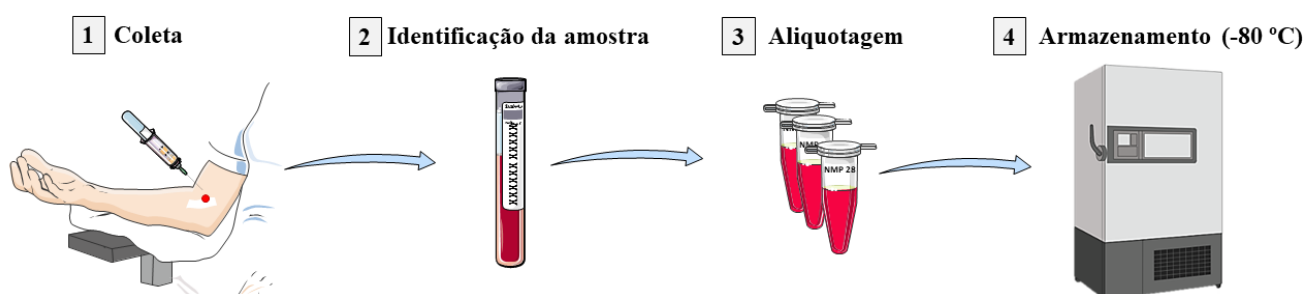
Os dados obtidos durante a pesquisa foram mantidos em anonimato durante todo o período estabelecido e utilizadas apenas para fins investigativos.

#### 4.7. Coleta de dados do prontuário

Quanto aos dados contidos em prontuários, foram consultadas informações relacionadas ao gênero, idade, presença de esplenomegalia manifestação de eventos cardiovasculares, trombóticos ou hemorrágicos e dados do hemograma. Esses dados foram coletados e armazenados em um banco de dados para melhor organização e manuseio dos dados bem como montagem de banco de dados para posterior análise estatística.

#### 4.8. Coleta de sangue e armazenamento

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em três tubos com sistema a vácuo contendo EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2*), ideais para coleta de amostra que serão usadas em testes moleculares. São excluídas amostras com quantidade abaixo de 2 mL, hemolisadas, coaguladas ou lipêmicas. Em seguida, a amostra foi aliqotada em criotubos, identificadas com o código do paciente e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

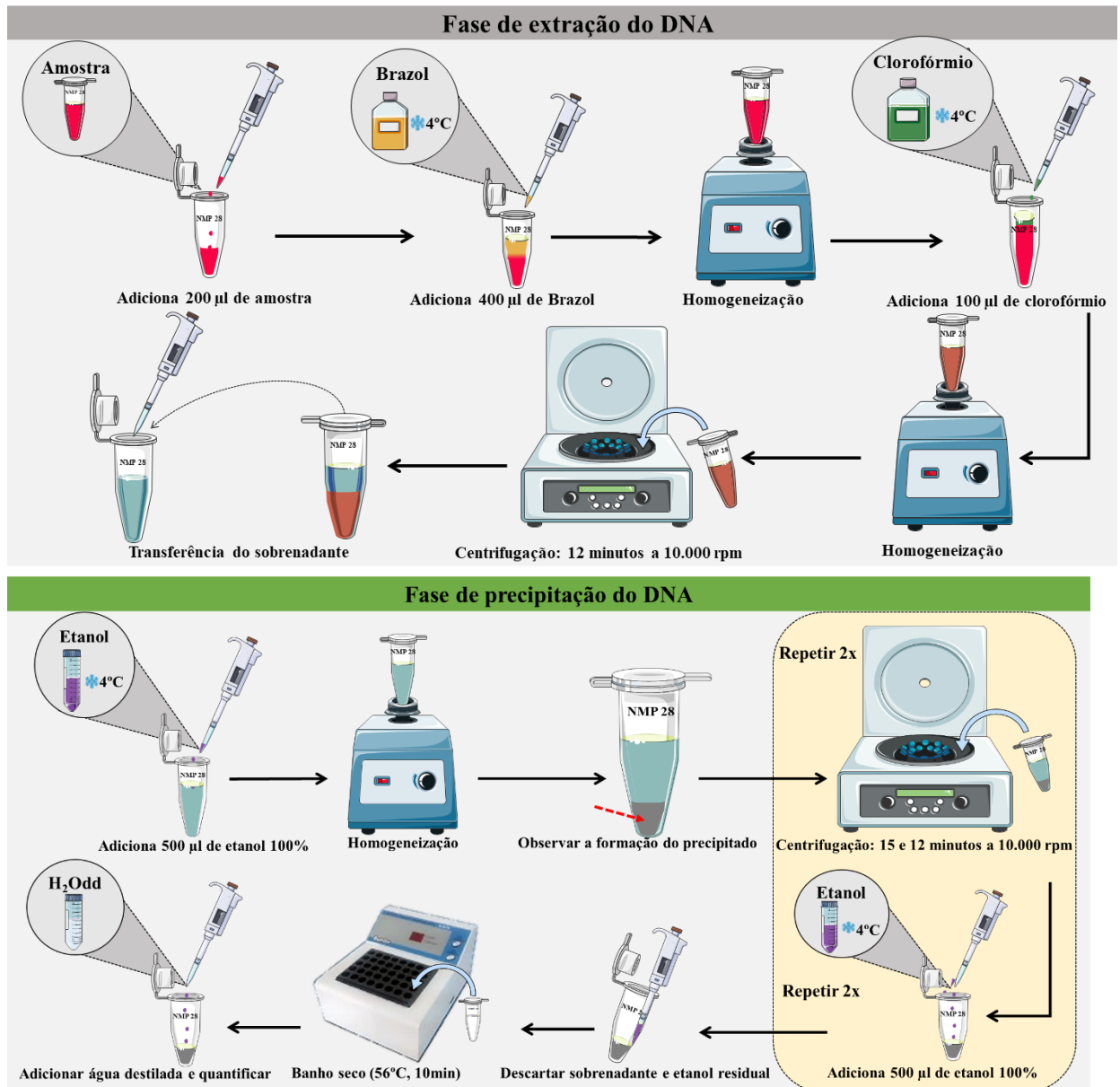


**Figura 13:** Processo de coleta, identificação, aliqotagem e armazenamento de amostra.  
**Fonte:** Paes (2023).

#### 4.9. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com Brazol, está ilustrada na Figura 14, e seguiu as recomendações do fabricante (Anexo 9.4).





**Figura 14:** Processo de extração de DNA e precipitação de DNA. Legenda: H<sub>2</sub>Odd – água destilada dupla; rpm – rotações por minuto; min – minutos

**Fonte:** Paes (2023).

A quantificação do material extraído foi realizada por espectrofotometria com o *Nanodrop modelo 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA)*, aferindo-se as relações 260/280 e 230/260, sendo que esta última mensura também a qualidade da amostra. Em seguida, o material será armazenado (-80 °C) até a realização das análises moleculares.

#### 4.10. Análise molecular

A identificação dos pacientes positivos para variante *JAK2V617F* foi realizada pela Msc. Dania Isamary Gutiérrez Torres durante seu projeto de mestrado intitulado “Caracterização molecular de variantes no gene *JAK2* em pacientes com Neoplasias

Mieloproliferativas crônicas *BCR::ABL1* negativo”, o qual também faz parte do projeto principal em que se encontra a presente pesquisa.

A investigação molecular foi dividida em 4 etapas: desenho de oligonucleotídeos iniciadores, reação em cadeia da polimerase, purificação da PCR por PEG e sequenciamento.

#### 4.10.1. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

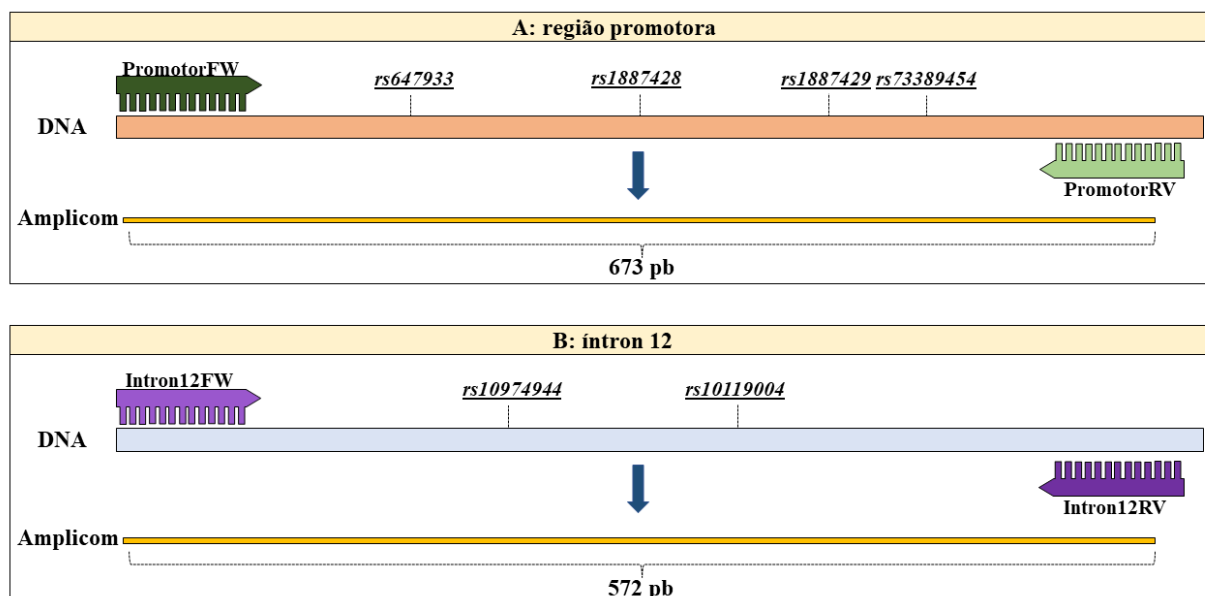
Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para investigação das variantes de interesse. O delineamento da região foi realizado com base na sequência de referência do gene *JAK2* (NG\_009904.1) e a localização das variantes de interesse disponibilizadas pelo Relatório de Referência SNP (dbSNP) do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI - (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). As sequências (gene e variantes) foram armazenadas no software *Geneious* (*Biomatters*, v6.0.6), onde foi realizado um mapeamento dos SNVs na sequência do gene de referência, o que facilita a seleção da área de desenho dos oligonucleotídeos e futura análise genética.

Após seleção da área gênica, fez-se a elaboração dos iniciadores na ferramenta *online OligoAnalyzer* (disponível em: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) considerando as concentrações de oligonucleotídeos (0,25  $\mu$ M), Magnésio (2,5 mM), Sódio e desoxirribonucleotídeos trifosfatados (ambos a 0 mM). Características estruturais e termodinâmicas como tamanho, temperatura de *melting* ( $T_m$ ), *Selfdímero* (*SD*), *Heterodímero* (*HD*) e *Harpin* (*H*) também foram avaliadas nesta mesma ferramenta. Em seguida, as sequências dos primers passaram por análise no *PrimerBlast* (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), outra ferramenta do NCBI utilizada para mensurar a especificidade dos iniciadores com os alvos de interesse.

O conjunto de primers, descrito no quadro 5, foi desenhado conforme ilustrado na Figura 15. Os iniciadores designados para a região promotora (PromotorFW e PromotorRV) flanqueiam uma região com 4 SNVs de potencial interesse (*rs6476933*, *rs73389454*, *rs1887428*, *rs1887429*). Já os iniciadores relacionados ao íntron 12 (Íntron12FW e Índron12RV) flanqueiam uma região com duas variantes já descritas na literatura, uma delas (*rs10974944*) com grande associação à *JAK2V617F*.

**Quadro 5:** primers desenhados para as reações de PCR

| Região    | Primer     | Sequência (5' → 3')       | Amplicon |
|-----------|------------|---------------------------|----------|
| Intron 12 | IntronFW   | CCAACTGAGTTTCCTTGCA       | 572 pb   |
|           | IntronRV   | CTAGGTTAAGAGTATGTGGTCC    |          |
| Promotor  | PromotorFW | GTCATGGGACTGGTTCATTCTCATC | 673 pb   |
|           | PromotorRV | TTTCGGCTTTTCCTCCACCTCC    |          |

**Figura 15:** Estratégia para o desenho dos *primers* para as regiões de interesse no presente estudo: [A] região promotora e [B] íntron 12.

Fonte: Geneious, 2022 - adaptado.

#### 4.10.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do material genético foi realizada por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). A concentração das reações está descrita na tabela 1 e ciclagem no quadro 6.

**Tabela 1:** Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR.

| Regentes                 | Íntron 12 | Promotor |
|--------------------------|-----------|----------|
| H <sub>2</sub> O         | -         | -        |
| Tampão (10x)             | 1x        | 1x       |
| MgCl <sub>2</sub> (50Mm) | 1,5mM     | 2,5mM    |
| Primer FW (10 µM)        | 0,4 µM    | 0,4 µM   |
| Primer RV (10 µM)        | 0,4 µM    | 0,4 µM   |
| dNTP mix (10 mM)         | 0,2 mM    | 0,2 mM   |
| TAQ 5U/µL                | 1 U       | 1 U      |
| DNA                      | > 30 ng   | > 30 ng  |

**Quadro 6:** ciclagem utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR)

| <b>Íntron 12</b>   |                      |              |               |
|--------------------|----------------------|--------------|---------------|
| <b>Temperatura</b> | <b>Fase</b>          | <b>Tempo</b> | <b>Ciclos</b> |
| 94°C               | Desnaturação inicial | 4 minutos    | 1x            |
| 94°C               | Desnaturação         | 30 segundos  | 40x           |
| 58°C               | Anelamento           | 30 segundos  |               |
| 72°C               | Extensão             | 40 segundos  |               |
| 72°C               | Extensão final       | 7 minutos    | 1x            |
| <b>Promotor</b>    |                      |              |               |
| <b>Temperatura</b> | <b>Fase</b>          | <b>Tempo</b> | <b>Ciclos</b> |
| 94°C               | Desnaturação inicial | 4 minutos    | 1x            |
| 94°C               | Desnaturação         | 30 segundos  | 40x           |
| 64°C               | Anelamento           | 30 segundos  |               |
| 72°C               | Extensão             | 45 segundos  |               |
| 72°C               | Extensão final       | 7 minutos    | 1x            |

Os produtos das reações foram visualizados mediante eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio

#### **4.10.3. Purificação da PCR com polietilenoglicol (PEG)**

Após a amplificação, o material será purificado com polietilenoglicol (PEG) visando a remoção de nucleotídeos e iniciadores não incorporados na PCR que podem interferir na reação de sequenciamento(122). O protocolo seguiu as orientações do fabricante e está demonstrado no Anexo 9.8. Antes de armazenar as amostras a -80 °C, armazene a 4-5 °C por algumas horas para melhor eluição de DNA. Por último, quantificar as amostras pelo menos 3 dias após precipitação, passando do freezer (-80 °C) à geladeira 4-5 °C pelo menos 2 horas antes da quantificação.

#### **4.10.4. Sequenciamento e análise de seqüências**

Aproximadamente 5-30 ng de produto de PCR purificado foi aplicado na reação de sequenciamento. O sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado usando BigDye® Terminator v3.1 (*Applied Biosystems*), seguindo recomendações do fabricante e os primers descritos anteriormente. Os produtos foram purificados pelo protocolo de EDTA/Etanol, e

avaliados no sequenciador automático 3500 XL *Genetic Analyzer*® (*Applied BioSystems*, USA), com polímero POP-7. As sequências foram inicialmente analisadas no software *Sequencing Analysis* (*Applied biosystem [Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil]*). Software *Geneious* 6.0.6 (*Biomatters, USA*) usado para fazer o mapeamento das variantes e comparação com a sequência de referência *Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2)*, (NCBI: NG\_009904.1).

#### **4.11. Análise de DL e haplótipos**

As frequências dos haplótipos foram calculadas usando o software Haploview (v.4.2), como medida do Desequilíbrio de Ligação (DL). Haplótipos com frequências <1% não foram considerados relevantes para comparações. O grau de *pairwise* entre os nucleotídeos foi analisado pela estrutura LD, considerando valores de  $r^2 > 0,8$  como DL forte,  $< 0,8$  para fraco e  $< 0,1$  como DL negativo. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado comparando as frequências estimadas com as observadas dos genótipos pelo teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

#### **4.12. Análise estatística**

Os resultados obtidos passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%), e foram testadas pelo Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) e teste exato de Fisher com intervalo de confiança de 95%. As variáveis numéricas foram expressas por mediana (Md) e intervalo interquartil [IIQ] com percentil de 75% através do software GraphPad Prism v.9.0.2. Para as variáveis não paramétricas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Para ambas as análises foi realizado o pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações, também pelo software GraphPad Prism v.9.0.2. Valores de  $p < 0.05$  consideraram-se estatisticamente significativos.

## 4.13. Cronograma de atividades

| Nº | Atividades   | 01/2021 |     |     |     |     |     | 02/2021 |     |     |     |     |     |
|----|--|---------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  | Jan     | Fev | Mar | Abr | Mai | Jun | Jul     | Ago | Set | Out | Nov | Dez |
| 01 | Créditos – Disciplinas   | C       | C   | C   | C   | C   | C   | C       | C   | C   | C   |     |     |
| 02 | Revisão Bibliográfica  | C       | C   | C   | C   | C   | C   | C       | C   | C   | C   | C   | C   |
| 03 | Coleta de amostras   |         |     |     |     |     | C   | C       | C   | C   | C   | C   | C   |
| 04 | Desenho dos primers  |         |     |     |     |     |     |         | C   |     |     |     |     |
| 05 | Elaboração do projeto para qualificação                        |         |     |     |     |     |     |         |     |     | C   | C   | C   |
| 06 | Qualificação   |         |     |     |     |     |     |         |     |     |     |     | C   |
| Nº | Atividades   | 01/2022 |     |     |     |     |     | 02/2022 |     |     |     |     |     |
|    |  | Jan     | Fev | Mar | Abr | Mai | Jun | Jul     | Ago | Set | Out | Nov | Dez |
| 01 | Qualificação   |         |     | C   |     |     |     |         |     |     |     |     |     |
| 02 | Revisão Bibliográfica  | C       | C   | C   | C   | C   | C   | C       | C   | C   | C   | C   | C   |
| 03 | Créditos – Disciplinas   | C       | C   | C   | C   | C   |     |         |     |     |     |     |     |
| 04 | Coleta de amostras   | C       | C   | C   | C   | C   |     |         |     |     |     |     |     |
| 05 | Extração de DNA  |         |     |     |     |     |     |         | C   | C   |     |     |     |
| 06 | Padronização da PCR  |         |     | C   | C   |     |     |         |     |     |     |     |     |
| 07 | PCR e sequenciamento para o haplótipo 46/1                     |         |     |     |     |     |     |         | C   | C   | C   | C   |     |
| Nº | Atividades   | 03/2023 |     |     |     |     |     |         |     |     |     |     |     |
|    |  | Jan     | Fev | Mar | Abr | Mai | Jun | Jul     | Ago | Set | Out | Nov | Dez |
| 01 | PCR e sequenciamento para o haplótipo 46/1 (promotor e íntron) | C       | C   | C   | C   |     |     |         |     |     |     |     |     |
| 02 | Sequenciamento da região codificante de <i>JAK2</i>            | C       | C   | C   | C   |     |     |         |     |     |     |     |     |
| 03 | Organização e tabulação dos resultados                         |         | C   | C   | C   |     |     |         |     |     |     |     |     |
| 04 | Análises Estatísticas  |         | C   | C   | C   |     |     |         |     |     |     |     |     |
| 05 | Redação da dissertação   | C       | C   | C   | C   | C   | C   |         |     |     |     |     |     |
| 06 | Elaboração dos artigos e relatórios                            |         |     |     |     | C   | C   |         |     |     |     |     |     |
| 07 | Defesa pública   |         |     |     |     |     |     | C       |     |     |     |     |     |

**Legenda:** C – cumprido.

#### 4.14. Equipe do projeto

|    | <b>Integrantes do projeto</b>    | <b>Instituição</b> | <b>Formação acadêmica</b>     | <b>Função no projeto</b>                             |
|----|----------------------------------|--------------------|-------------------------------|--|
| 01 | Jhemerson Fernandes Paes         | HEMOAM             | Biomédico                     | Execução do projeto                                  |
| 02 | Lucivana Prata de Souza Mourão   | HEMOAM             | Bióloga, Dra.                 | Orientadora  |
| 03 | Andréa Monteiro Tarragô          | HEMOAM             | Farmacêutica-Bioquímica, Dra. | Coorientadora  |
| 04 | George Allan Villarouco da Silva | HEMOAM             | Biólogo, Dr.                  | Colaborador  |
| 05 | Dania Isamary Gutiérrez Torres   | HEMOAM             | Biomédica                     | Coleta de amostra, identificação de <i>JAK2V617F</i> |
| 06 | Allyson Guimarães da Costa       | HEMOAM             | Enfermeiro, Dr                | Colaborador  |
| 07 | Adriana Malheiro Alle Marie      | HEMOAM             | Bióloga, Dra.                 | Colaboradora   |
| 08 | Deborah Canté de Aquino          | HEMOAM             | Bióloga                       | Coleta de amostras biológicas                        |
| 09 | Emanuela Vitória Barbosa Alves   | HEMOAM             | Biomédica                     | Coleta de amostras biológicas                        |
| 10 | Erycka Alves de Mesquita         | HEMOAM             | Farmacêutica                  | Coleta de amostras biológicas                        |
| 11 | Miliane Araújo de Sousa          | HEMOAM             | Biomédica                     | Coleta de amostras biológicas                        |

#### **4.15. Financiamento e infraestrutura**

O projeto possui financiamento próprio, sendo realizado nos laboratórios Multidisciplinar de Pesquisa e Laboratório de Genômica da Fundação HEMOAM. Leituras de Sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Genômica no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### CAPÍTULO I:

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

Torres, D.G.; Paes, J.; da Costa, A.G.; Malheiro, A.; Silva, G.V.; de Souza Mourão, L.P.; Tarragô, A.M. JAK2 variant signaling: genetic, hematologic and immune implication in chronic myeloproliferative neoplasms. *Biomolecules* 2022, 12, 291.

**Artigo de revisão publicado na revista *Biomolecules***

DOI: 10.3390/biom12020291

ISSN 2218-273X)

Fator de Impacto: 4.87

Qualis CAPES A1



## Sinalização da Variante JAK2: Implicação Genética, Hematológica e Imunológica em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas

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>, Jorge V. Silva<sup>1,3,4</sup>, Lucivana P. de Souza Mourão<sup>1</sup> e Andréa M. Tarragô<sup>1,5,\*</sup>

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

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

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

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

5 Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), Manaus 69050-001, AM, Brasil

\* Autores a quem a correspondência deve ser endereçada.

### RESUMO

A variante *JAK2* V617F constitui uma alteração genética de maior frequência nas neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativas, que é causada pela substituição de um G > T na posição 1849 e resulta na substituição de valina por fenilalanina no códon 617 da cadeia polipeptídica. Características clínicas, morfológicas e genéticas moleculares definem os critérios diagnósticos de policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária. Atualmente, *JAK2* V617F está associado a hematopoiese clonal, instabilidade genômica, desregulações na hemostasia e resposta imune. Os clones *JAK2* V617F induzem uma resposta imune inflamatória e levam a um processo de imunotrombose. Pesquisas recentes têm demonstrado grande interesse em tentar entender os mecanismos associados à sinalização de *JAK2* V617F e ativação de respostas celulares e moleculares que contribuem progressivamente para o desenvolvimento de condições inflamatórias e vasculares em associação com neoplasias mieloproliferativas crônicas. Assim, o objetivo desta revisão é descrever os principais achados genéticos, hematológicos e imunológicos que estão ligados à sinalização da variante *JAK2* em neoplasias mieloproliferativas crônicas.

**Palavras-chave:** sinalização *JAK2* V617F; neoplasias mieloproliferativas; hematopoiese clonal; hemostasia; imunotrombose; resposta imune.

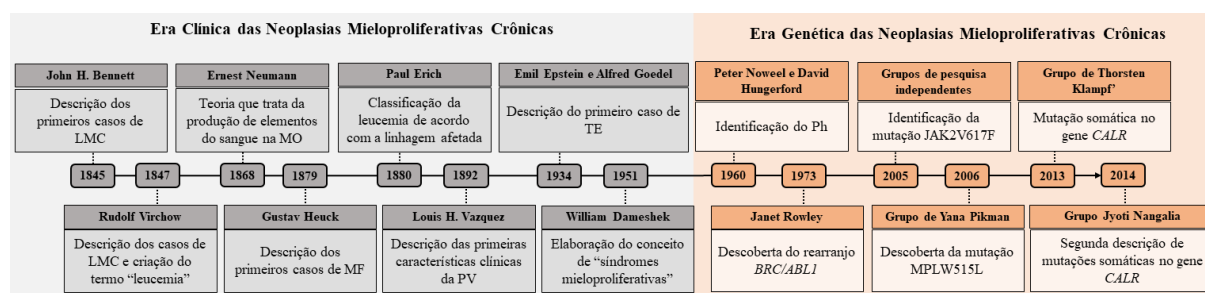
### 1. Introdução

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPs) são patologias clonais de células-tronco hematopoiéticas [1], que se caracterizam por hiperplasia medular e acúmulo de elementos da série mieloide, e apresentam maturação progressiva e efetiva [2], porém sem afetar a maturação e diferenciação processo da linhagem eritroide, granulocítica e

megacariocítica [ 3 ]. Essas alterações levam a leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocitária, trombocitose e, em casos mais graves, fibrose medular ou transformação leucêmica [2].

Os primeiros estudos sobre NMPs datam de 1845, iniciando com a descrição do primeiro caso de leucemia mieloide crônica [4]. Desde então, vários estudiosos se dedicaram à análise do mecanismo molecular das neoplasias mieloproliferativas crônicas, determinando os aspectos semiológicos dessas doenças hematológicas por meio da observação dos sinais, sintomas e achados clínicos dos pacientes investigados [5,6,7] .

Essa visão clínica ganhou um novo aliado em 1960 com a descoberta do cromossomo Filadélfia, que foi a primeira associação entre uma anormalidade cromossômica e uma doença oncológica descrita na história da medicina [3,4,8,9] . A partir dessa descoberta, a história dos NMPs mostra que eles entraram na era da genética, quando mais estudos começaram a ser desenvolvidos e as pesquisas genéticas ganharam mais espaço no diagnóstico dos NMPs ( Figura 1 ) .



**Figura 1.** Linha do tempo das neoplasias mieloproliferativas. Em cinza, pode-se ver a era clínica dos NMPs, baseada em aspectos semiológicos. Em laranja, destaca-se a era genética dos NMPs, pois a pesquisa genética associada permitiu identificar alterações genéticas que são marcadores de alguns NMPs, importante fator que auxilia no diagnóstico. LMC: leucemia mieloide crônica; BCR/ABL: Rearranjo genético BCR/ABL.

Assim, com as descobertas dos mecanismos moleculares envolvidos nos NMPs, a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinou parâmetros clínicos e laboratoriais para estabelecer o diagnóstico dessas doenças e a OMS, de acordo com sua última revisão em 2016, classifica as neoplasias mieloides crônicas de acordo com o presença ou ausência do cromossomo Filadélfia (gene de fusão *BCR/ABL1*) [10,11]. Na classificação NMP positiva para *BCR/ABL1*, a leucemia mieloide crônica (LMC) é responsável por 15 a 20% das leucemias em todo o mundo, com incidência de 1 a 2/100.000. A LMC é caracterizada pela presença de um desvio à esquerda nos granulócitos que resulta na identificação de menos de 20% dos blastos no sangue periférico [4,10].

Ao contrário da CML (única entidade *BCR/ABL1* positiva, de acordo com a OMS), doenças pertencentes ao grupo de *BCR/ABL1* NMPs negativas foram descritas, incluindo

policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (ET), mielofibrose primária (PMF), leucemia neutrofílica crônica (CNL), leucemia eosinofílica crônica (CEL) e neoplasias mieloproliferativas não classificáveis [10,11]. No entanto, a policitemia vera, a trombocitemia essencial e a mielofibrose primária são as doenças mais frequentes neste grupo [10,12,13], tendo a MFo pior prognóstico das três doenças mieloproliferativas [12,14]. Assim como na LMC, nos NMPs *BCR/ABL1* negativos, os critérios são estabelecidos com base em achados genéticos, hematológicos e clínicos, que são organizados na forma de critérios maiores e menores para o diagnóstico de PV, ET e PMF, conforme Tabela 1.

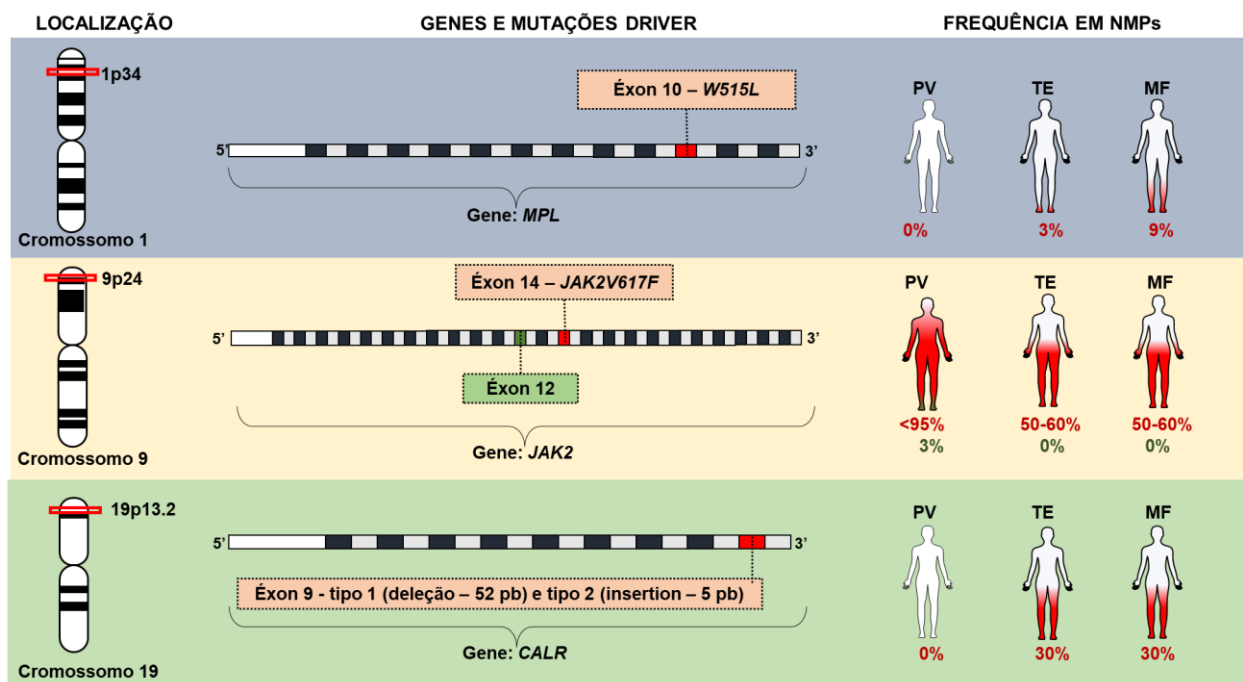
**Tabela 1.** Critérios diagnósticos para neoplasias mieloproliferativas crônicas clássicas negativas para *BCR/ABL1*.

| Neoplasia | Descrição clínica   | Principais critérios de diagnóstico   | Critérios de diagnóstico menores  |
|-----------|---|---|---|
| PV        | Aumento exacerbado da massa eritrocitária (contagem total de glóbulos vermelhos). Geralmente, ambos os sexos são diagnosticados na 6ª ou 7ª década de vida [ 11 ]. A incidência global anual é de 0,3–1,5/100.000 e a taxa de sobrevida é de 15 anos [ 2 ].                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hb: &gt;16,5 g/dL para homens (ou Hct: &gt;49%), &gt;16,0 g/dL para mulheres (ou Hct: &gt;48% mulheres) ou &gt;25% de aumento na massa de hemácias [ 2 ] ;</li> <li>• A biópsia da medula óssea demonstra panmielose com megacariócitos maduros pleomórficos;</li> <li>• Presença da mutação <i>JAK2</i> V617F ou mutações no exon 12 do gene <i>JAK2</i> .</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução da concentração sérica de eritropoietina [ 10 ].</li> </ul>  |
| ET        | Aumento da contagem de plaquetas com hiperplasia megacariocítica. A incidência global anual é de 1,03–2,5/100.000 e o diagnóstico geralmente ocorre na 6ª década de vida [ 15 , 16 ]. Juntamente com a PV, apresenta alto risco de episódios hemorrágicos e trombóticos [ 3 , 12 , 17 , 18 ]. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contagem de plaquetas <math>\geq 450 \times 10^3 / \text{mm}^3</math> ;</li> <li>• Hiperproliferação de megacariócitos (alguns deles hiperlobulados, observados em biópsia de medula óssea);</li> <li>• Aumento leve da granulopoiese e eritropoiese;</li> <li>• Ausência de critérios para PV, CML e PMF;</li> <li>• Presença de mutações no gene <i>JAK2</i> (<i>JAK2</i> V617F), <i>CARL</i> , <i>MPL</i> .</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presença de marcador clonal ou ausência de evidência de trombocitose reativa [ 10 ].</li> </ul>  |
| PMF       | Curso clínico indolente e de pior prognóstico. Os pacientes apresentam megacariopoiese aumentada e hematopoiese extramedular [ 2 , 3 , 19 , 20 ] Tem uma incidência global anual de 1,5–2,0/100.000 e geralmente afeta indivíduos com mais de 60 a 70 anos de idade.                          | <p>Fase pré-fibrótica:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferação exacerbada da linhagem megacariocítica e granulocítica, ausência de fibrose reticulínica &gt;1, eritropoiese diminuída e hiper celularidade medular para a idade do paciente;</li> <li>• Ausência de critérios para CML, PV e ET;</li> <li>• Presença de mutações no gene <i>CALR</i> , <i>JAK2</i> (<i>JAK2</i> V617F) ou <i>MPL</i> ou outro marcador clonal.</li> </ul> <p>Fase fibrótica:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferação megacariocítica e atipia, acompanhadas de reticulina grau 2 ou 3 e/ou fibrose de colágeno;</li> <li>• Não preenche os critérios para PV, ET, CML, MDS ou outras neoplasias mieloides;</li> </ul> | <p>Fase pré-fibrótica:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia sem causa conhecida;</li> <li>• Leucocitose <math>11 \times 10^3 / \text{mm}^3</math></li> <li>• Esplenomegalia palpável;</li> <li>• Aumento da desidrogenase láctica.</li> </ul> <p>Fase fibrótica:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia sem causa conhecida;</li> <li>• Leucocitose <math>11 \times 10^3 / \text{mm}^3</math> ;</li> <li>• Esplenomegalia palpável;</li> <li>• Desidrogenase láctica aumentada</li> <li>• Leucoeritroblastose.</li> </ul> |

|  |  |   |  |
|--|--|---|--|
|  |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presença de mutações no gene <i>CALR</i>, <i>JAK2</i> (<i>JAK2</i> V617F) ou <i>MPL</i> ou ausência de fibrose reativa.</li> </ul> |  |
|--|--|---|--|

NMP: neoplasias mieloproliferativas; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial; MF: mielofibrose primária; Hb; hemoglobina; Ht: hematócrito; LMC: leucemia mielóide crônica; MPL: gene do receptor de trombopoietina; CALR: gene da calreticulina.

Dentre os principais critérios de NMP *BCR/ABL1* negativo, destacam-se a presença de variantes em genes drivers, bem como o gene Janus quinase 2 (*JAK2* —HGNC: 6192), o gene do receptor de trombopoietina (*MPL* —HGNC: 7217) e o gene da calreticulina (*CALR* —HGNC: 1455). Variações nesses genes, classificadas como mutações driver, são determinantes no fenótipo clínico observado em NMPs e resultam na ativação constitutiva de vias de sinalização intracelular [12,19] (Figura 2). Geralmente, essas variações genômicas são consideradas mutuamente exclusivas entre entidades *BCR/ABL1* negativas, e sua ausência não exclui seu diagnóstico [10]. No entanto, duas variantes podem ser encontradas no mesmo indivíduo, provavelmente de diferentes subclones neoplásicos e frequentemente associados à progressão da doença [19,21].



**Figura 2.** Mutações condutoras nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR* associadas a neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPs).

Essas mutações de driver geralmente surgem novamente; entretanto, 7% dos casos envolvem agregação familiar, com herança autossômica dominante e penetrância incompleta, e risco 5 a 7 vezes maior para parentes de primeiro grau do paciente com a doença, risco que pode envolver as mesmas ou diferentes neoplasias mieloproliferativas

[22,23,24]. Embora *JAK2* V617F esteja ligado à herança autossômica dominante, a maioria dos casos de herança familiar não está associada a variantes do gene *JAK2* [25]. No entanto, mutações no gene *EPOR*, *VHL*, *EPAS1*, *HIF* e *EGLN* foram encontrados em casos de policitemia familiar congênita [26].

Assim, alguns fatores determinantes associados às mutações driver devem ser considerados, como mutações (somáticas ou germinativas) menos específicas para NMPs, sexo, frequência da variante alélica e ordem de aquisição das mutações [27]. Em TE e MF, 12% dos pacientes não apresentam nenhuma das mutações condutoras e são chamados de triplo-negativos. No entanto, análises de sequenciamento completo do exoma identificaram mutações nos genes *JAK2* e *MPL* que apresentam uma alta taxa de transformação leucêmica nesses pacientes [28].

Entre as mutações condutoras, a variante *JAK2* V617F é a mais frequente no desencadeamento de PV, ET e PMF [10], que são considerados um critério maior na policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária [5, 29,30,31]. A variante *JAK2* V617F apresenta frequência maior que 95% em indivíduos com PV, e frequência de 55% a 65% em indivíduos com TE e PMF, respectivamente [32]. A presença de V617F causa sinalização aberrante da via JAK/STAT, que é uma via intracelular envolvida em diversos processos biológicos, como hematopoiese, resposta imune e ativação de outras vias de sinalização intracelular. Assim, a compreensão dos mecanismos de sinalização de *JAK2* V617F e das principais células envolvidas na imunotrombose pode fornecer uma base para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas em doenças mieloproliferativas.

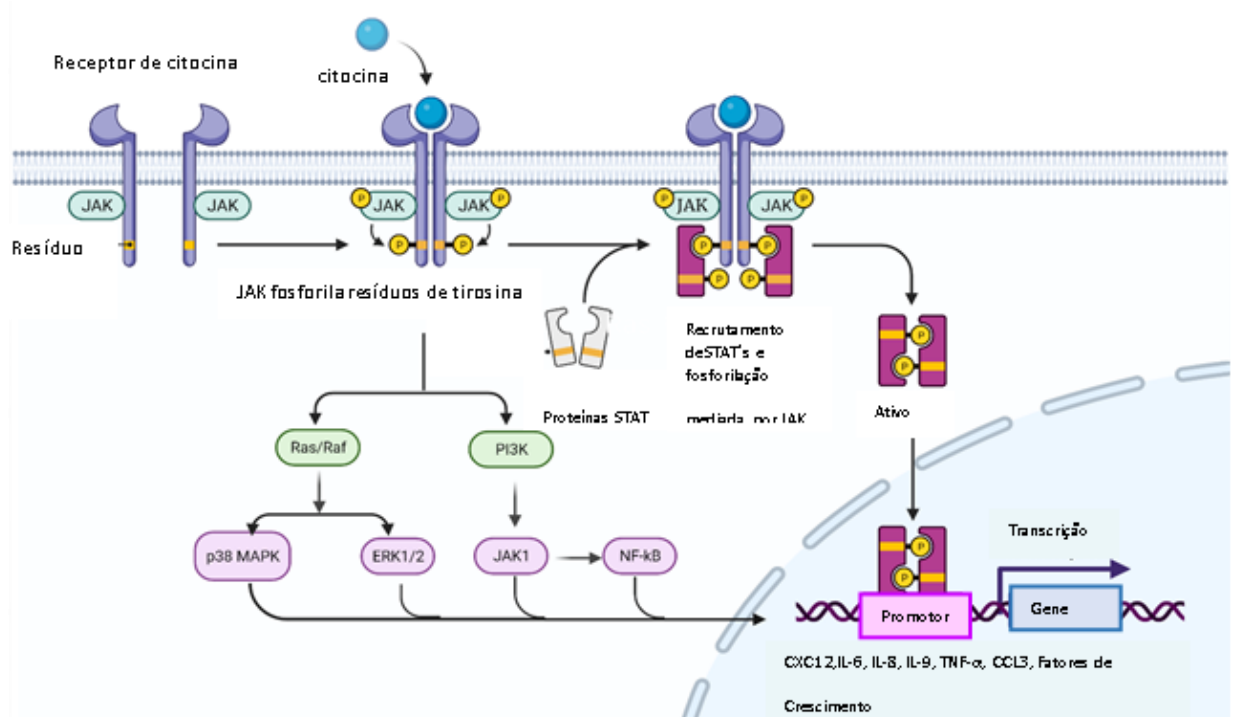
A sinalização constitutiva de *JAK2* V617F está ligada à alta expressão de moléculas que estão relacionadas à resposta inflamatória, desregulação imune e manifestação de estados inflamatórios [33,34,35], achado que atualmente constitui alvos de pesquisa. As citocinas relacionadas à imunidade natural são as mais expressas nas neoplasias mieloproliferativas crônicas, sendo detectadas até mesmo no estroma medular [34]. Isso sugere que a inflamação está relacionada ao início do estroma da medula óssea, que promove fibrose medular e expansão clonal [35]. No sangue periférico, a interação entre Células hematopoiéticas, endotélio e moléculas imunológicas positivas para V617F potencializam o mecanismo de imunotrombose, constituindo assim um fator prognóstico independente e desfavorável na sobrevida de pacientes com NMPs [36].

Assim, a compreensão dos mecanismos de sinalização de *JAK2* V617F e das principais células envolvidas na imunotrombose pode fornecer uma base para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas em doenças mieloproliferativas. Portanto, nesta revisão,

descrevemos a variante *JAK2* V617F e suas implicações para a instabilidade genômica e desregulação imune, bem como sua relação com o início da inflamação crônica por meio de mecanismos celulares.

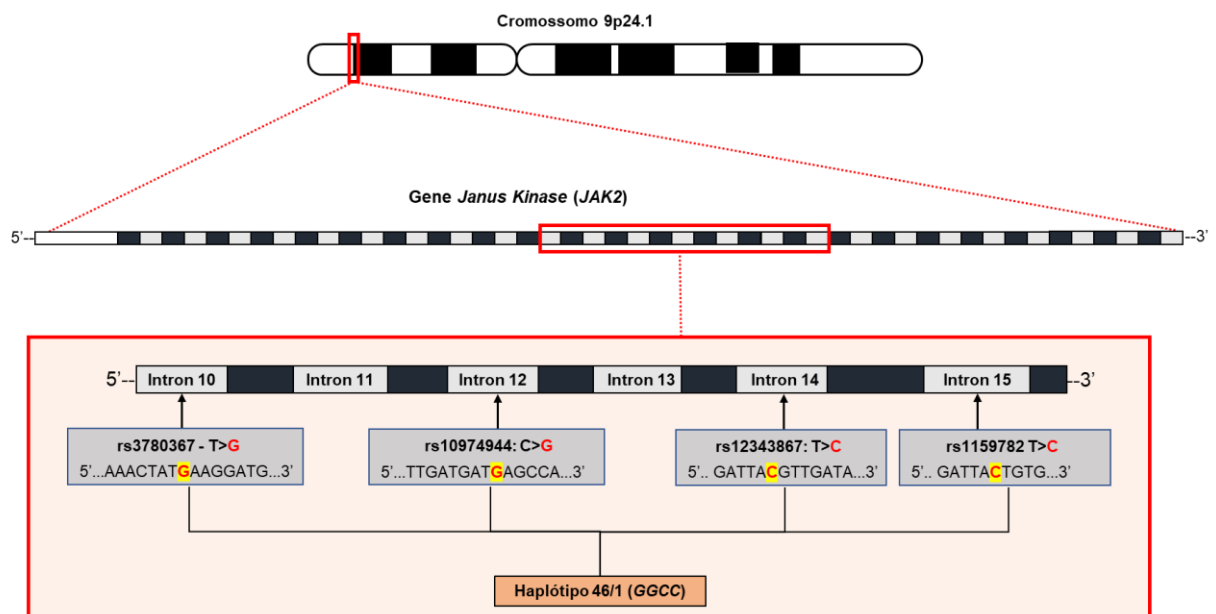
## 2. *JAK2* V617F: Implicação Genética nas Vias de Sinalização

Em 2005, foi descrita a base molecular das doenças mieloproliferativas crônicas, com a variante *JAK2* V617F (dbSNP ID: *rs77375493*) caracterizada por uma substituição de base do tipo transversão no nucleotídeo 1849 (1849G > T) do éxon 14 do gene *JAK2* que codifica uma valina através de uma fenilalanina na posição 617 (V617F) [ 37 , 38 , 39 ]. Metabolicamente, esta alteração genética leva a uma mutação de ganho de função em *JAK2*, uma tirosina quinase citoplasmática com um papel central na transdução de sinal de receptores do fator de crescimento hematopoiético [ 40 , 41]. Essa alteração ocorre no domínio pseudoquinase de *JAK2*, interrompendo o efeito autoinibitório e resultando em fosforilação constitutiva, que gera hiperfosforilação, desregula sinais celulares a jusante da via de sinalização *JAK2*/STAT5 ( Figura 3 ), interfere na sinalização correta de receptores de eritropoietina (EPO), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF) e trombopoietina (TPO), e também aumenta a proliferação celular e a resistência à apoptose [ClinVar ID: NM\_004972.3 (*JAK2*): c.1849G > T (p. V617F))] [ 3 , 41 , 42 ].



**Figura 3.** Via de sinalização *JAK/STAT*. Na ausência de citocinas, a proteína JAK permanece inativa em regiões próximas aos domínios intracelulares do receptor. Quando uma citocina se liga a um receptor, *JAK* proteínas e domínios intracelulares do receptor são fosforilados, ativando e recrutando proteínas STAT, que dimerizam e translocam para o núcleo para iniciar o processo de transcrição de genes envolvidos na proliferação celular. Além da ativação da via *JAK/STAT*, existe uma interligação com outras vias de sinalização intracelular, entre as mais destacadas estão a via Ras/Raf/MAPK e a via PI3K; esta última manifestando interconexão com as proteínas JAK1, que ativam indiretamente a via NFkB, os fatores transcricionais que ativam a produção de citocinas (entre elas CXCL12, IL-6, IL-8, IL-9, TNF- $\alpha$  e CCL3) e o crescimento fatores identificados no perfil inflamatório de indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas. *JAK*: Proteína Janus quinase; *STAT*: transdutores de sinal e ativadores da transcrição; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K: fosfoinositol quinase 3; JAK1: proteína Janus quinase classe 1; NFkB: kappa de célula B de fator nuclear de cadeia leve; CXCL12: quimiocina 12 com motivo CXC; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; IL-9: interleucina 9; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; CCL3: ligante de quimiocina 3.

A análise de células germinativas, como células bucais, células T ou ambas, em casos de agrupamento familiar de distúrbios mieloproliferativos, mostra ausência do alelo variante. Nesse cenário, a variante *JAK2* V617F não é o primeiro evento que leva à doença [22,40,43]. O haplótipo 46/1 é uma região de 280 Kb do cromossomo 9p que inclui três genes, incluindo *JAK2*. A parte denominada “GGCC” corresponde aos quatro principais polimorfismos desse haplótipo (*rs3780367*, *rs10974944*, *rs12343867* e *rs1159782*) que se iniciam no íntron 10 e terminam no íntron 15 do gene *JAK2* [44,45] ( Figura 4). Essas quatro variantes estão em completo desequilíbrio de ligação e são herdadas juntas [44,46]. Este haplótipo é descrito como um dos responsáveis pelos processos que antecedem a aquisição do *JAK2* V617F, aumentando a taxa de mutação do locus *JAK2* e a probabilidade de adquirir mutações com vantagem seletiva, que é o caso do *JAK2* V617F e que, por sua vez, , causa distúrbios mieloproliferativos clonais [31,45,46,47,48].





**Figura 4.** Caracterização do haplótipo 46/1 sem o gene *JAK2*. O haplótipo, também denominado GGCC, é alterado por quatro variantes localizadas no íntron 10 (rs3780367: T > G), íntron 12 (rs10974944: C > G), íntron 14 (rs12343867: T > C) e íntron 15 (rs1159782: T > C). Pensa-se que a presença deste haplótipo condiciona um aumento da taxa de mutação do locus génico em questão, resultando assim no aparecimento de mutações com vantagem seletiva, como é o caso do *JAK2 V617F*.

Ainda não está claro como a mesma mutação está associada a três fenótipos diferentes da doença. Possíveis explicações incluem diferenças interindividuais no background genético, aquisição de alterações genéticas adicionais ou na célula-alvo para transformação [43]. Assim, *JAK2 V617F* pode até mesmo comprometer a funcionalidade de linhagens celulares que integram os processos hematopoiéticos e inflamatórios.

### **3. Implicações da Variante *JAK2 V617F* em Células Positivas e Imunotrombose**

Estudos recentes têm descrito a relação entre os mecanismos e respostas imunes expressas por células envolvidas no sistema imune inato e adaptativo (neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos, células endoteliais e plaquetas) com moléculas importantes da hemostasia, fenómeno atualmente chamado de imunotrombose. O processo de imunotrombose é multifatorial, geralmente mediado pela hiper celularidade, e provoca alterações nas proteínas plasmáticas que são importantes no processo de hemostasia e ativação de moléculas endoteliais, produto de adesão e função celular [49,50,51]. A hiper celularidade no sangue periférico é resultado da ativação constitutiva da via *JAK2/STAT5*, que aumenta a viscosidade do sangue por meio da interação célula-célula-endotelial e até forma complexos plasmáticos [49,50,51,52,53]. Assim, as características de leucocitose, eritrocitose e trombocitose em pacientes com NMPs não refletem apenas alterações quantitativas na hematopoiese, mas também alterações qualitativas na resposta imune e na hemostasia, por meio da expressão de moléculas que favorecem o fenótipo pró-trombótico ativado [50]. Está bem descrito na literatura que as complicações vasculares do tipo arterial ou venoso atingem até um terço dos indivíduos com NMPs e constituem uma das principais causas de mortalidade nesses indivíduos [51,52,54,55,56], principalmente em TE [53].

A ativação da via *JAK/STAT* está envolvida na resposta inflamatória por se interligar diretamente com outras vias de sinalização intracelular envolvidas na produção de citocinas. Di Rosa e cols. [57] demonstraram que células CD34+ de indivíduos com PMF apresentaram ativação desregulada da via *JAK2/STAT1* e ativação significativa de genes envolvidos na via *IFN- $\gamma$*  (*IFN- $\gamma$* , *IRF1* e *IFNGR2*) em comparação com indivíduos saudáveis, e observaram que *IFN I* e *II* têm sido descritos como mediadores da imunidade antitumoral através da ativação da

via PI3K/AKT/mTOR, que, por sua vez, ativa a via NFkB e promove a apresentação de antígenos e secreção de citocinas [56].

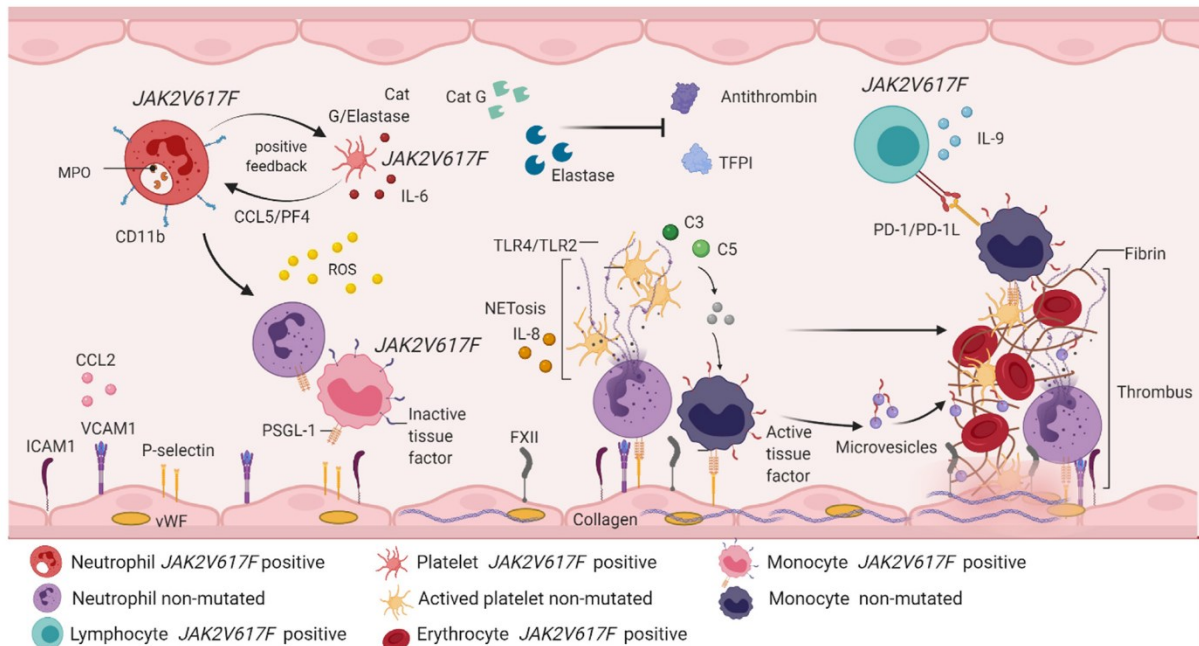
Por outro lado, a ação da proteína de morte programada (PD-1), mediada pela expressão de IFN- $\gamma$ , que é vital no processo de reconhecimento tumoral, está desregulada em pacientes com NMPs, indicando que células hematopoiéticas *JAK2 V617F* positivas de indivíduos com Os NMPs expressam o ligante PD-L1, que é um mecanismo que bloqueia a ação dos linfócitos Th e contribui para o escape imunológico das células neoplásicas [58,59]. Ao mesmo tempo, isso resulta em sinalização de JAK2/STAT3 até três vezes maior que o normal, fato que está ligado à progressão tumoral associada à inflamação [55]. O ensaio experimental murino realizado por Prestipino et al. [60] demonstrou atividade oncogênica de JAK2 com consequente fosforilação de STAT3 e STAT5 que facilita a promoção da atividade PD-L1 em células *JAK2 V617F* positivas e afeta o ciclo de progressão celular de células T, que é um achado associado a estados mais avançados de NMPs.

Na MF, há uma regulação alterada das células T, que é determinada pela ativação significativa de linfócitos T CD8+, e esse achado está ligado à ativação de moléculas HLA classe I, inflamação crônica e desregulação imunológica, favorecendo assim a ativação de fibroblastos e contribuindo para a progressão da fibrose medular e citopenias [54]. Curiosamente, a ativação constitutiva de *JAK2 V617F* não só produz alterações na resposta imune celular pelas vias clássicas, como também favorece a ativação indireta da secreção de fatores induzíveis por hipóxia (HIF) e eritropoietina (EPO) pela via NFkB, gerando um estado hipóxico de gravidade variável que favorece a atrofia tecidual e produção de progenitores eritroides, evento que contribui para a produção de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico [58].

Portanto, *JAK2 V617F* desregula complexamente a sinalização intercelular através da ativação da produção de citocinas e interrupção da homeostase e citotoxicidade das células imunes [48]. A desregulação imune em indivíduos com NMPs é confirmada por altas concentrações de IL-6, IL-8, GM-CSF, HGF, VEGF, b-FGF e TGF- $\beta$  em células do estroma medular e aumento da produção de IL-6, IL-8, IL-9, CCL3, CCL4 e TNF- $\alpha$  em células sanguíneas periféricas [59].

O quadro inflamatório está relacionado ao excesso de citocinas (geralmente IFN tipo I e pertencentes à família IL-6), produto da sinalização constitutiva da via JAK2/STAT5/STAT3, que ativa diretamente outras vias de sinalização intracelular comprometidas com o produção de citocinas pró-inflamatórias [28]. As vias PI3K, MAPK, NFkB e HIF1- $\alpha$  induzem tumorigênese

[31] e expressão de mecanismos mediadores da inflamação em neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos e plaquetas [60] ( Figura 5 ).



**Figura 5.** A imunotrombose envolve a participação de células hematopoiéticas e células do sistema imunológico. Os neutrófilos *JAK2 V617F* positivos expressam CD11b na superfície celular e secretam enzimas como MPO, catepsina G e elastase. A liberação de catepsina G e elastase ativa a sinalização CCL5/PF4 em *JAK2V617F* positivo de plaquetas, que é uma interação que cria retroalimentação positiva entre plaquetas e neutrófilos, e favorece a produção de IL-6 e ERO. A catepsina e a elastase livres inibem a função da antitrombina e do TFPI plasmático, contribuindo para o fenótipo trombótico. Os neutrófilos não mutados são ativados pela ação das ERO, que recrutam e ativam monócitos com expressão de PSGL-1 e fator tecidual inativo. Ambas as células manifestam adesão rolante e endotelial por moléculas de adesão de ligação expressas em células endoteliais (ICAM1, VCAM1, P-selectina, CCL2 e FXII). Simultaneamente, as células endoteliais são ativadas pela ação das ERO, liberando vWF e colágeno, formando assim uma interação plaqueta-monócito-neutrófilo, que favorece a descarga de material genético e proteico do neutrófilo, iniciando-se a NETose. Isso traz consigo a expressão de IL-8 e a ativação de TLR4/TLR2 nas plaquetas, fato que permite a expressão de glicoproteínas receptoras e, portanto, a agregação plaquetária. Na NETose, os eritrócitos são recrutados e liberam hemoglobina e aumentam a produção de ERO. O sistema complemento é ativo em resposta à ativação de células imunes, principalmente pela ação de C3 e C5, que induz a sinalização de Monócitos *JAK2 V617F* positivos e monócitos não mutados. Monócitos positivos *JAK2 V617F* expressam PD-1L, que ativa imediatamente PD-1 em *JAK2* Linfócitos V617F, mecanismo responsável pela evasão da resposta imune descrita nas neoplasias mieloproliferativas crônicas. O recrutamento e a ativação de células imunes e hematopoiéticas favorecem a conversão do fibrinogênio em fibrina, dando origem à formação de trombos, principal fator envolvido nas complicações vasculares descritas nas neoplasias mieloproliferativas. MPO: mieloperoxidase; CCL5: quimiocina ligando 5; PF4: fator plaquetário 4; IL-6: interleucina 6; ROS: espécies reativas de oxigênio; TFPI: inibidor do fator tecidual plasmático; PSGL-1: ligando 1 da selectina P; ICAM-1: moléculas de adesão intercelular 1; VCAM-1: molécula de adesão celular vascular 1; CCL2: ligante 2 de quimiocina; FXII: fator XII; vWF: fator de Von Willebrand; IL-8: interleucina 8; TLR2/TLR4: Receptor Toll-like 2/4; C3: componente 3 do complemento; C5: componente 5 do complemento; PD-1: proteína de morte programada; PD-L1: ligante 1 da proteína de morte programada.

### 3.1. Neutrófilos

Os neutrófilos constituem uma grande porcentagem de leucócitos no sangue periférico e estão envolvidos em processos de resposta imune contra antígenos. Os neutrófilos de indivíduos com NMPs têm quantidades basais abundantes de espécies reativas de oxigênio

(ROS), especialmente em pacientes com PMF, que são induzidas por sinalização ERK dependente de JAK2 e fosforilação constitutiva, produzindo NADPH oxidase e ativação de neutrófilos pela expressão de mieloperoxidase [61].

A ativação e recrutamento de leucócitos contribui para a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que são redes formadas por material genético e proteínas derivadas de neutrófilos, e que favorecem a ativação celular, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação e agregação plaquetária e dano endotelial [62]. Os neutrófilos ativados expressam CD11b na superfície celular e secretam elastase e mieloperoxidase, o que favorece a quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e macrófagos e facilita a adesão endotelial [63,64,65,66]. Simultaneamente, a expressão das integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  nos neutrófilos recrutados é favorecida, e as glicoproteínas são expressas pela interligação da via JAK/STAT com Rap1-GT-Pasa, que possuem afinidade por moléculas de adesão de células vasculares (VCAM-1) e por moléculas intercelulares moléculas de adesão (ICAM-1) expressas por células endoteliais [67,68,69,70], aumentando assim a adesão endotelial. Da mesma forma, a expressão do ligante 1 da selectina P (PSGL-1) e da molécula de adesão celular tipo 1 (MAC-1) em neutrófilos contribui para a liberação de catepsina G (enzima de degradação neutrofílica importante na eliminação de patógenos e na degradação de componentes em sítios inflamatórios), que juntamente com a elastase, determina um feedback positivo através da expressão de CCL5 e fator plaquetário 4 (PF4) nas plaquetas, estimulando a expressão de P-selectina e GPIIb nas plaquetas e favorecendo o processo de trombogênese [52]. Um achado interessante é que tanto a elastase quanto a catepsina G bloqueiam o inibidor da via do fator tecidual (TFPI) e a antitrombina (AT), que são dois potentes anticoagulantes naturais, e isso contribui para a ativação da via do receptor da proteinase 4 (PAR4) nas plaquetas, Exposição ao fator de Von Willebrand e início da cascata de coagulação [51,71].

Assim, a ativação de neutrófilos permite a liberação de complexos DNA-histona (especialmente H3 e H4) que induzem a produção de NETs e ativação plaquetária via NF-kB e função de TLR2 e TLR4 [67], com consequente expressão de GPaIIb3 contribuindo para a agregação plaquetária e formação de trombina na via extrínseca [68]. Complexos histona-MPO também foram encontrados no plasma de indivíduos com NMPs e associados a altos níveis de LDH [61]. Como tal, a NETosis desempenha um papel crucial na expansão do tumor em NMPs, aumentando a imunotrombose e ativando a hemostasia, formando assim um ciclo repetitivo [66].

Como já sabemos da participação ativa dos neutrófilos no processo de imunotrombose nos NMPs, tem havido grande interesse em identificar os subtipos de neutrófilos envolvidos nesse

mecanismo. Os neutrófilos associados a tumores (TANs), também classificados como PMN-MDSCs, podem ser subdivididos em N1 (neutrófilos com ação antitumoral) e N2 (neutrófilos com ação pró-tumoral) [68,72,73], tanto em humanos quanto modelos murinos, e são encontrados na circulação e no microambiente de pacientes com condições tumorigênicas e inflamatórias [70]. Os TANs contribuem diretamente para o processo de angiogênese através da liberação significativa de ROS e consequente formação de NETs através da expressão de CD11b e elastase [71].

A presença de TANs também é documentada em processos de infiltração, invasão e metástase de tumores sólidos, como melanoma, carcinoma gástrico avançado, tumor cerebral infantil [72] e até mesmo em casos de pancreatite aguda [74,75,76,77]. Nesses tipos de tumores, os TANs são sensíveis a sinais microambientais causados pela secreção de CXCL1, CXCL2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-8 [70], o que favorece a invasão local, superexpressão funcional de neutrófilos e supressão funcional de T linfócitos. No entanto, o papel dos TANs em malignidades hematológicas tem sido pouco descrito. Em 2019, o estudo de Podaza e Risnik [78] objetivou detectar TANs em indivíduos com leucemia linfocítica crônica (LLC) e descobriu que a proporção de TANs em pacientes com LLC era maior, com altas concentrações de IL-8, molécula importante na indução de NETs. Infelizmente, devido à escassa descrição de marcadores de superfície nessa classificação de neutrófilos, a pesquisa não discrimina os fenótipos TAN (N1/N2) encontrados, que são definidos pela capacidade de produção de ROS e NETs. No entanto, alguns estudos recentes têm como objetivo descrever a fenotipagem dessas subpopulações de neutrófilos para melhor caracterizá-las, especialmente seu papel nas doenças hematológicas.

### 3.2. plaquetas

A ativação e disfuncionalidade plaquetária é um fenômeno bem descrito em processos trombóticos e hemorrágicos em pacientes com NMPs, valendo ressaltar que alguns marcadores plaquetários, como P-selectina, CD41L,  $\beta$ -tromboglobulina, PF4 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), foram detectados em altas concentrações no plasma de indivíduos com ET e PV [52,54], que são biomarcadores associados a complicações trombóticas. A expressão desses marcadores induz uma resposta hemostática por meio da exposição e ativação do fator tecidual (produto da lesão endotelial), ativando diretamente a via extrínseca da cascata de coagulação e consequente produção de fibrina. Nesse processo, as plaquetas ativadas expõem fosfolipídios carregados negativamente que conferem reação proteolítica dos fatores de coagulação, atuando como mediadores entre a coagulação e a

inflamação por meio da ativação da cascata do complemento, principalmente das moléculas C3 e C5 [66] .

Curiosamente, pacientes com NMPs também podem manifestar altos níveis basais de fosfatidilserina na membrana plaquetária, que por sua vez desenvolve uma função pró-coagulante, achado que demonstra que as plaquetas são o alvo central no desenvolvimento de complicações vasculares e inflamatórias em NMPs [75]. Assim, a presença da mutação *JAK2* V617F poderia potencializar a ativação plaquetária e contribuir para a trombose persistente nesses pacientes.

Por outro lado, a circulação constante de complexos e a ativação de proteínas plaquetárias podem expor moléculas derivadas de células endoteliais, favorecendo a ativação e dano endotelial através da sinalização TLR-4 nas plaquetas [76] . Assim, a ativação endotelial é promovida por altos níveis de espécies reativas de oxigênio, que são liberadas por complexos neoplásicos plaquetas-neutrófilos que levam à exposição do fator de Von Willebrand, colágeno, moléculas de adesão plaquetária-endoteliais (PECAM), E-selectinas e trombosmodulina , assim como o CD40L (importante fator indutor tecidual), que são todas moléculas que favorecem a adesão endotelial e estão diretamente envolvidas no quadro trombótico ativado [ 75 , 79]. No processo ativo de hemostasia, detecta-se a expressão de alguns biomarcadores, como trombina, DD, FVIII, fibrinogênio, CD40L e integrinas plaquetárias; que, juntamente com fator tecidual, proteína S, proteína C, fator de Von Willebrand e P-selectinas, favorece a perpetuação da hemostasia ativa, adesão celular e recrutamento de leucócitos e eritrócitos [76] . Embora as plaquetas formem complexos com os neutrófilos, também foram encontrados agregados plaquetas-monócitos, especialmente em pacientes com TE [77].

A interação entre plaquetas e células endoteliais provavelmente contribui para a produção de selectinas solúveis e redução de óxido nítrico (consequência de altos níveis de espécies reativas de oxigênio e MPO), o que beneficia a redução dos vasos laminares e a obstrução vascular [51,80] . Poisson et al. [81] fornecem a confirmação disso, em que as células endoteliais apresentavam uma disfunção da via do óxido nítrico, causa do acúmulo de microvesículas derivadas de eritrócitos portadores de MPO, que aumentavam o estresse oxidativo endotelial e comprometiam a resposta vascular aos vasoconstritores. Isso implica em uma possível participação dos eritrócitos nesse processo. Portanto, nas células hematopoiéticas, o estresse oxidativo e o estado de inflamação crônica são favorecidos pelo ciclo vicioso da produção de biomacromoléculas que contribui para a instabilidade genômica, aquisição de mutações, dano tecidual e transformação da leucemia aguda [82,83] .

Por outro lado, quadros hemorrágicos também podem se apresentar em pacientes com NMPs, e estão ligados ao aumento do consumo de plaquetas (produto da trombogênese) devido à ausência de ligação com multímeros de alto peso molecular do fator de Von Willebrand e disfuncionalidade da plaquetopenia. grânulos densos [84]. No entanto, complicações hemorrágicas são mais frequentemente descritas em indivíduos com MFe PV, em comparação com aqueles com TE [85]. Um achado importante sobre isso é que indivíduos com *ASXL1*-PMF mutado têm um prognóstico ruim e um alto risco de complicações na hemostasia [86]. Infelizmente, ainda não foi estabelecida uma relação entre mutações no *ASXL1* e o desenvolvimento de distúrbios hemorrágicos em pacientes com MF.

Matsuura et al. [87] observaram redução significativa de grânulos densos em plaquetas em plaquetas *JAK2* V617F positivas, sugerindo que a hiperativação em *JAK2* afeta o desenvolvimento de um conjunto desses grânulos em plaquetas no processo de trombopoiese. Como resultado, o papel que a sinalização de *JAK2* desempenha no controle de grânulos densos em plaquetas nunca foi relatado.

### 3.3. monócitos

Os monócitos desempenham importante papel no processo de imunotrombose, sendo também um fator prognóstico independente e desfavorável na sobrevida de pacientes com PV e MFP, pois são mediadores de inflamação, trombose e fibrose medular devido à secreção de altas concentrações de citocinas e a apresentação de uma resposta desequilibrada à IL-10. Na medula óssea, a sinalização de citocinas pró-inflamatórias promove a interação entre o clone maligno e as células do estroma, o que estimula a osteoclastogênese no nicho endosteal e causa o surgimento de clones de fibrócitos envolvidos na indução da fibrose medular na MF [36]. Este mecanismo é promovido através da desregulação do ciclo celular em fibroblastos, e acelera o processo de mal-diferenciação de modo que perde a capacidade de reparar o tecido hematopoiético (pode ser um produto do estresse oxidativo) e contribui para a fibrose da medula [88].

Usando sequência de RNA de célula única, Leimkuhler et al. [89] demonstraram que transcriptômica de células estromais mesenquimais de pacientes com mielofibrose primária mostram perda de suporte de nicho hematopoiético, diminuição do status da célula progenitora multipotente, sinalização *JAK/STAT* e *TGF-β* regulada positivamente e regulação positiva de proteínas da matriz extracelular como o colágeno.

Indiretamente, a ativação de monócitos é determinada pela exposição a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos

(DAMPs), proporcionando assim exposição ao fator tecidual e CD25 e beneficiando a ativação de proteínas com ação pró-coagulante e sinalização de NFkB [90].

Por outro lado, a ativação de monócitos pode ser favorecida pela expressão e ligação de PSGL-1 à P-selectina plaquetária, favorecendo a expressão de citocinas inflamatórias [71]. Portanto, a interação plaqueta-monócito induz um fenótipo pró-inflamatório através da expressão de CD147, PSGL-1, EP1/EP2 e COX-2, bem como a ativação de integrinas que contribuem para a adesão endotelial e recrutamento de monócitos [91]. A confirmação disso é encontrada no estudo de Wei Wang et al. [52], em que macrófagos *JAK2* V617F positivos manifestaram alta expressão de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico sintase (iNOS), ligante-2 quimiocina (CCL2) e ativação da *MAPK* caminho, e eles observaram que os monócitos mostraram rolamento e adesão celular notavelmente distintos quando comparados às células do tipo selvagem.

É importante mencionar que os macrófagos são subdivididos em tipo M1 e tipo M2, que ambos os subtipos celulares são ativados pela via de sinalização NFkB e que possuem funções celulares semelhantes a N1 e N2, respectivamente [92]. O M2 é o maior componente nos tecidos neoplásicos e contribui diretamente para o ambiente tumoral, proliferação, angiogênese e liberação de citocinas que levam à expansão neoplásica [93]. No entanto, M2 foi subclassificado em M2a, M2b e M2c; embora seja importante notar que o acúmulo de monócitos/macrófagos de M2b pode promover crescimento, invasão e recorrência de cânceres *in vitro* e *in vivo* [93].

No estudo de Molitor et al. [94], foi observado que *JAK2* V617F positivo M2 em pacientes com PMF apresentaram maior capacidade de formação de colônias através da secreção de moléculas pró-fibróticas, como CCL2, IL-8, metaloproteinase-9 de matriz (MMP9), galectina 3 (LGALS3) e osteopontina (SPP1), que impulsionam a proliferação e produção de colágeno. No entanto, mais pesquisas são necessárias sobre o papel das subclasses de macrófagos em diferentes fenótipos de NMP.

### 3.4. Linfócitos T Helper e Natural Killer

Embora os linfócitos não estejam bem descritos nos NMPs, essas células também podem estar envolvidas na desregulação imune. Os linfócitos T têm uma longa vida útil e isso possivelmente contribui para uma maior sinalização de efeitos disruptivos no sistema imunológico [95]. Em alguns casos de MFP, os linfócitos T carregam de 3 a 83% da frequência do alelo variante de *JAK2* V617F, acompanhados de anormalidades no cariótipo, como 13q-, 20q-, monossomia 7 e inv(3). Note-se que estas duas últimas alterações cromossômicas



conferem um prognóstico desfavorável [95,96,97,98]. Assim como nos linfócitos, o papel das células natural killer (NK) nos NMPs não foi amplamente descrito.

As células NK estão associadas ao controle do crescimento tumoral e da metástase, o que indica que a deficiência de células NK é muito rara e geralmente está ligada a distúrbios linfoproliferativos [98]. No entanto, o estudo de Arantes [99] demonstrou que os pacientes positivos para células NK *JAK2 V617F* apresentavam contagens mais baixas de *NKCD16 + CD56<sup>dim</sup>* em comparação com células NK. Pacientes *JAK2 V617F*-negativos, especialmente aqueles com PV e PMF, que é um achado que sugere que as células NK podem ser defeituosas em NMPs. Embora existam algumas investigações sobre o papel de linfócitos e células NK nessas doenças hematológicas, mais pesquisas são necessárias para elucidar seu papel na evolução dessas doenças e no desenvolvimento de imunotrombose em NMPs.

#### 4. Resumo e Perspectivas

A abordagem clínica dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas baseia-se no controle das complicações vasculares, tanto arteriais quanto venosas, visto que são eventos que resultam na principal causa de morbidade e mortalidade por doenças hematológicas. De acordo com investigações recentes, as complicações trombohemorrágicas são atribuídas à presença e alta frequência alélica de *JAK2 V617F* [100], sugerindo que a presença do haplótipo *JAK2 46/1* não tem sido relacionada à produção de biomarcadores inflamatórios que podem ser expressos em imunotrombose [101]. Da mesma forma, a ligação entre *JAK2V617F* e desregulações na resposta imune e hemostasia está bem descrita e associada à interligação da via JAK/STAT com outras vias de sinalização intracelular, como PI3K/AKT, Ras/Raf/MAPK e NFκB, no processo apoptótico e em a produção de moléculas inflamatórias [59]. Além disso, investigações de sequenciamento de próxima geração descreveram outros genes envolvidos nessas vias de sinalização (*FLT3, GNAS, KIT, KRAS, NF1, NRAS, PTPN11* e *SH2B3*), em genes reguladores epigenéticos (*TET2, ASXL1, DNMT3A* e *EZH2*) e negativos genes reguladores da via de sinalização *JAK2* (*SOCS* e *CBL*), uma vez que mostraram uma forte associação com desregulações na produção e secreção de citocinas [102,103]. Estes poderiam ser excelentes alvos de pesquisa em mecanismos patogênicos de NMP e serem empregados como preditores de pior desfecho clínico, risco de estratificação ou mesmo como preditores de transformação de leucemia [104].

O Grupo de Trabalho Internacional—Pesquisa e Tratamento de Neoplasias Mieloproliferativas (IWG–MRT) estabeleceu um algoritmo prognóstico para complicações trombóticas em comum com neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativas,

especialmente em PV e TE, com base nas variáveis de idade (> 60 anos) , percentual de homozigose de *JAK2* V617F e história de eventos trombóticos, que são fatores que definem as categorias de baixo risco, risco muito baixo, risco intermediário e alto de complicações trombóticas e vasculares [5] .

A terapia citorrredutora em indivíduos com PV, TE e MF é frequentemente escrutinada, mas amplamente utilizada para aliviar o quadro clínico e reduzir o risco dessas complicações. Assim, a droga de escolha em indivíduos com PV e TE é a hidroxiureia (HU). Infelizmente, a resistência ou intolerância à HU foi descrita em 15–20% dos pacientes com NMP [105]. Esse fenômeno é um desafio no tratamento desses pacientes, pois reduz as opções terapêuticas e aumenta a progressão da doença ou o risco trombótico [105]. Muitas investigações a esse respeito têm sido realizadas e sugerem que a existência de outras alterações moleculares no domínio quinase da proteína *JAK2* ou em genes não controladores poderia ser a razão da refratária farmacológica [106,107].

O ruxolitinibe, medicamento aprovado há alguns anos pelo FDA, também é considerado uma excelente escolha farmacológica em pacientes resistentes à HU na PV [108]. No entanto, modelos murinos demonstraram que sua ação farmacológica não apresenta atividade antileucêmica *in vivo* na medula óssea [109], achado que poderia sugerir uma possível contribuição de outra sinalização celular desregulada, sendo um alvo que também seria interessante no prognóstico desses pacientes. Na MF, o tratamento de escolha é a HU, e o uso de ruxolitinibe para casos refratários à HU e pacientes classificados como de alto risco [109]. Em pacientes jovens de alto risco com MF, o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas é considerado. No entanto, o uso de drogas citorrredutoras para fibrose reticular ou colágeno aumentaria as chances de sobrevida desses indivíduos; vale ressaltar que o PMF é a neoplasia mieloproliferativa crônica *BCR/ABL1* negativa com maior associação com transformação leucêmica.

Por outro lado, a inibição da função plaquetária nas neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativas é uma das principais funções, pois, conforme descrito anteriormente, as plaquetas desempenham papel central no processo de imunotrombose. Assim, o uso de agentes antiplaquetários reduz a taxa de ocorrência e recorrência de eventos trombohemorrágicos e inflamatórios [80]. A heparina de baixo peso molecular, a aspirina e o clopidogrel são as principais drogas utilizadas no controle da ativação plaquetária. Apesar de serem as drogas mais utilizadas nessas doenças, o uso de novas drogas que inibem a expressão de receptores plaquetários, moléculas de adesão plaquetária e citocinas favoreceriam a redução da formação de trombos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de imunotromboses [ 5]. Da

mesma forma, a inibição da expressão de integrinas, moléculas de adesão e outras proteínas de membrana em neutrófilos, monócitos, linfócitos e células endoteliais constitui uma estratégia promissora em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR/ABL1* negativas como alvos de tratamento [66], especialmente naqueles com drogas resistência e classificados como de alto risco.

Apesar da detecção de microvesículas, complexos celulares e outros marcadores inflamatórios têm sido amplamente discutidos em NMP, e a detecção de mi-RNAs é realmente considerada um marcador de resposta metabólica, antes, durante e após o tratamento do linfoma [110]. Além disso, o avanço das técnicas moleculares nos leva ao desenvolvimento de técnicas não invasivas, como a biópsia líquida, que pode ser uma ferramenta potencial, especialmente em cânceres não sólidos, para indicadores de prognóstico e monitoramento em neoplasias hematológicas [111]. Atualmente, a análise do DNA livre de células (cf) é proposta como uma ferramenta não invasiva para uso no diagnóstico e prognóstico de neoplasias hematológicas, que pode ser empregada para diferenciar subtipos de NMP, bem como para prever o desenvolvimento de complicações trombóticas [111,112].

### **Contribuições do autor**

**Conceituação:** DGT, JP, AMT e LPdSM; redação—preparação do projeto original: DGT, JP, AMT e LPdSM; redação—revisão e edição: AMT, LPdSM, AGdC, GVS e AM Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

**Financiamento:** Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) [Programa Pró-Estado—#002/2008, #007/2018 e #005/2019; Programa POSGRAD—#006/2021, Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

**Declaração do Conselho de Revisão Institucional:** Não aplicável.

**Declaração de Consentimento Informado:** Não aplicável.

**Declaração de Disponibilidade de Dados:** Não aplicável.

**Conflitos de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### **Referências**

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, 354, 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.; Gündem, 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.; Gündem, 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.; Boultonwood, 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.; Milanese, 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.; Helgadottir, 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.; Kubesova, B.; Pietra, D.; Gisslinger, B.; Milanese, 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.; Golub, 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. Malig. 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.; Triviai, I.; Brummer, T.; Finke, J.; Illert, A.L.; Ruggiero, E. Oncogenic *JAK2V617F* causes PD-1 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. Kaifia, 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.; Ehninger, 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. Leimkühler, 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.; Stalman, 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.; Buness, 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.; Kyrzcz-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. Habel, 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.; Crețoiu, 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

### **The Contribution of *JAK2* 46/1 Haplotype in the Predisposition to Myeloproliferative Neoplasms**

Paes J, Silva GAV, Tarragô AM, Mourão LP d. S. The Contribution of *JAK2* 46/1 Haplotype in the Predisposition to Myeloproliferative Neoplasms. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. 2022. p. 20.

**Artigo de revisão publicado na revista *International Journal of Molecular Sciences***

DOI: 10.3390/ijms232012582

(ISSN: 1422-0067)

Fator de Impacto (2021): 6.208

Qualis CAPES – Medicina II: A2



## A Contribuição do Haplótipo 46/1 de *JAK2* na Predisposição a Neoplasias Mieloproliferativas

Jhemerson Paes<sup>1</sup>, Jorge AV Silva<sup>1,2,3</sup>, Andréa M. Tarragô<sup>1,2,\*</sup> e Lucivana P. de Souza Mourão<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus 69850-000, AM, Brasil

<sup>2</sup>Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), Manaus 69050-001, AM, Brasil

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

\*Autores a quem a correspondência deve ser endereçada.

### RESUMO

O haplótipo 46/1 (GGCC) consiste em um conjunto de variações genéticas distribuídas ao longo do cromossomo 9p.24.1, que se estendem desde o gene *Janus Kinase 2* até *Insulin like 4*. Marcado por quatro variantes herdadas conjuntamente (*rs3780367*, *rs10974944*, *rs12343867* e *rs1159782*), este haplótipo tem uma forte associação com o desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas (NMPs) *BCR-ABL1*-negativas, pois precede a aquisição da variante *JAK2V617F*, alteração genética comum em portadores dessas neoplasias hematológicas. Também é descrito como um dos fatores que aumenta o risco de NMPs familiares em mais de cinco vezes, 46/1 está associado a eventos relacionados à desregulação inflamatória, esplenomegalia, trombose da veia esplâncnica, síndrome de Budd-Chiari, aumento na contagem de hemácias, plaquetas, leucócitos, hematócrito e hemoglobina, característicos dos NMPs, além de outros achados ainda em fase de elucidação e de grande interesse para o entendimento etiopatológico dessas neoplasias hematológicas. Considerando esses fatores, a presente revisão tem como objetivo descrever os principais achados e discussões envolvendo o haplótipo 46/1, destacar os aspectos moleculares e imunológicos e sua relevância como ferramenta para a prática clínica e investigação de casos familiares.

**Palavras-chave:** haplótipo da linha germinativa *JAK2*; neoplasias mieloides; haplótipo; patogênese molecular; polimorfismos de nucleotídeo único.

### 1. Introdução

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) consistem em um conjunto de cânceres hematológicos que se caracterizam pela hiperplasia de um ou mais elementos da série mieloide (leucócitos, plaquetas e hemácias) com maturação, proliferação efetivas [1,2,3] e a possibilidade de progressão para fibrose medular ou transformação leucêmica [4]. A incidência global é de seis casos por 100.000 indivíduos [5], afetando principalmente indivíduos entre 60 e 70 anos, sendo mais prevalente em homens brancos [3,5].

Para NMPs, a Classificação da OMS de Tumores de Tecidos Hematopoiéticos e Linfóides - 5ª edição, 2022, classifica as seguintes malignidades hematológicas: leucemia mielóide crônica (CML), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (ET), mielofibrose

primária (PMF), leucemia neutrofílica crônica (CNL), leucemia eosinofílica crônica (CEL), leucemia mielomonocítica juvenil (JMML) e neoplasia mieloproliferativa, sem outra especificação (NMP-NOS) [6,7]. O NMP *BCR/ABL1*—negativo [5]. O PV, ET e PMF são os mais frequentes (Tabela 1), e compartilham variações genéticas que ativam constitutivamente as vias de transdução de sinais fisiológicos responsáveis pela hematopoiese, o que leva a um aumento da proliferação mieloide, porém sem prejudicar a maturação e diferenciação celular [3,5,8,9].

**Tabela 1.** Características das neoplasias mieloproliferativas negativas para *BCR-ABL1*. NMP: neoplasias mieloproliferativas.

| NMP                            | Descrição clínica   | Epidemiologia  |
|--------------------------------|---|--|
| <b>Policitemia vera</b>        | Proliferação desregulada de elementos da série eritróide e aumento da contagem de granulócitos e trombócitos (panmielose) [4,5,7]   | Incidência de 0,5 a 4,0 casos por 100.000 indivíduos australianos [10], europeus [11,12], coreanos [13,14], neozelandeses [15] e norte-americanos [11] com idade entre 60 e 70 anos [5,14,15,16,17,18].  |
| <b>Trombocitemia essencial</b> | Número elevado de plaquetas no sangue periférico ( $>450 \times 10^9/L$ ), causado por hiperplasia megacariocítica na medula óssea, com alteração de outros setores medulares (eritrocíticos ou granulocíticos) de forma qualitativa ou quantitativa [4,5,19] | Afeta indivíduos entre a quinta e a sexta década de vida com incidência entre 0,9–2,4 casos por 100.000 em norte-americanos [20], coreanos [13,14] e neozelandeses [14,15,20].   |
| <b>Mielofibrose primária</b>   | NMP de pior prognóstico, caracterizado pela proliferação de megacariócitos e granulócitos predominantemente anormais na medula óssea, deposição de fibras de reticulina e hematopoiese extramedular [4,5,21]  | Afeta indivíduos entre a sexta e sétima década de vida [5] e tem incidência de 0,33 casos por 100.000 indivíduos por ano na América do Norte [15]; 0,4 casos por 100.000 na República da Coreia [14]; e 0,88 casos por 100.000 indivíduos na Nova Zelândia [15]. |

Nas MNMPs, a via JAK-STAT desempenha um papel importante na sinalização de citocinas e fatores de crescimento, que atuam na regulação da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, resposta imune e oncogênese [22,23,24]. Estudos anteriores relacionaram a ativação prolongada da sinalização JAK-STAT com o desenvolvimento aberrante de células-tronco hematopoéticas e malignidades hematológicas [25,26,27,28]. Essas alterações estão associadas à presença de variantes genéticas de ganho de função no gene *JAK2*, que codifica a proteína de mesmo nome. Essas variantes causam ativação constitutiva da via, resultando em mieloproliferação e produção de citocinas, que é o fenótipo definitivo dos NMPs [26,27,29].

## 2. Gene *Janus Quinase (JAK2)*

O gene *Janus quinase 2* (HGNC ID: 6192) está localizado no cromossomo 9p24.1 [30] e possui 142.939 pares de bases (pb) nos quais estão localizados a região promotora, 25 éxons, 25 íntrons e a região terminadora. A sequência de DNA codificadora (CDS) é composta por 3.399 nucleotídeos distribuídos entre o éxon 3 e 25, conforme estabelecido por sua sequência de referência (RefSeq.: NG\_009904.1; NM\_001322194.2), disponibilizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esse gene apresenta *splicing* alternativo, dando origem a sete transcritos de tamanhos que variam de 6900 a 7000 pb, e codifica três isoformas (A, B e C) da proteína Janus quinase 2 (JAK2) [30,31,32].

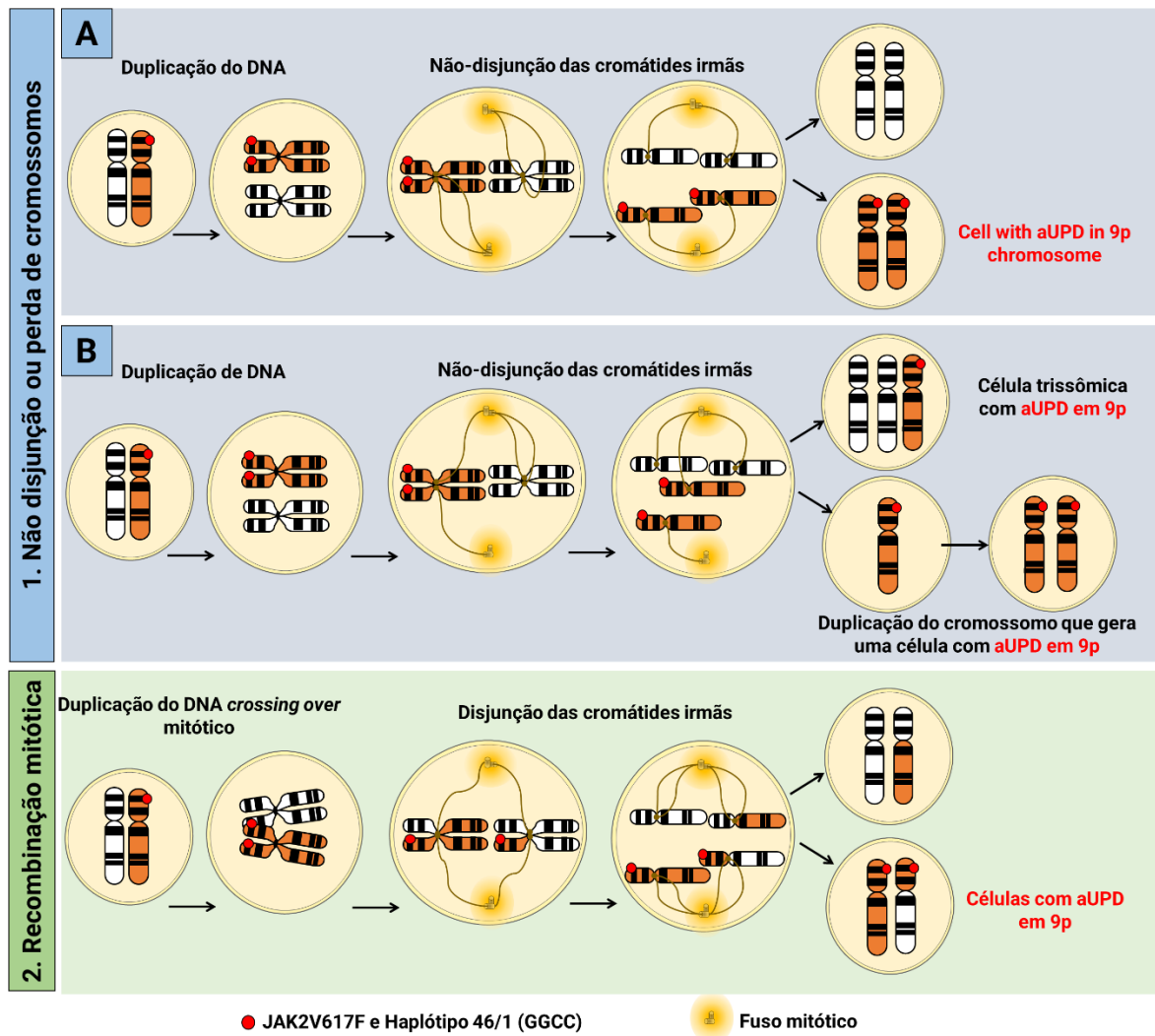
As proteínas JAK consistem em uma família de quinases citoplasmáticas não receptoras que englobam quatro tipos de proteínas de mamíferos: JAK2, que faz parte da sinalização de receptores homodiméricos, como o receptor de eritropoietina (EPOR), o receptor de trombopoietina (MPL) e a colônia de granulócitos fator estimulante (G-CSFR), que também são utilizados por alguns receptores heterodiméricos; e JAK1, JAK3 e tirosina quinase 2 (TYK2), que são úteis na sinalização de receptores heterodiméricos [21,27,29]. Estas proteínas são relativamente grandes e possuem aproximadamente 1150 aminoácidos e um peso molecular variando de 116 a 140 kDa [33]. JAK2 merece destaque devido ao seu papel no mecanismo de proliferação hematopoiética, principalmente em relação as NMPs.

JAK2 consiste em quatro domínios: dois domínios quinase, JH1 (tirosina quinase, cataliticamente ativa e localizada na porção C-terminal) e JH2 (pseudoquinase e cataliticamente inativa), que é responsável por inibir o domínio JH1 e promover ativação dependente de citocinas ; um domínio FERM-like (*4.1/ezrin/radixin/moesin*) constituído pelos domínios homólogos JH5, JH6 e JH7, localizado na porção N-terminal, responsável pela ligação não covalente de JAKs ao receptor de citocinas; e um domínio semelhante a SH2 (Src Homology 2), que contém os domínios homólogos JH4 e JH3 [21,34]. Estudos experimentais revelam que a deleção da linhagem germinativa homozigótica dos alelos JAK2 resulta em letalidade embrionária devido à eritropoiese ineficaz, uma vez que os progenitores hematopoiéticos deficientes em JAK2 não respondem à estimulação da eritropoietina [27,29]. Isso destaca a importância dos aspectos genéticos envolvendo o gene *JAK2*, seu *locus* e os eventos que afetam essa região, como a dissomia uniparental adquirida do cromossomo 9p.

### 2.1. Dissomia Uniparental Adquirida

As doenças oncológicas são caracterizadas pela instabilidade e pelo acúmulo gradativo de alterações genéticas ao longo do tempo [35], que são causadas por eventos genéticos intrínsecos à célula ou pela exposição a agentes mutagênicos externos [36]. A dissomia uniparental (UPD) é uma dessas alterações e é reconhecida como uma marca registrada dos genomas do câncer [35].

A UPD foi descrita em 1980 [37] e é definida como a ocorrência da herança de dois cromossomos homólogos da mesma origem parental [38], sendo causada por erros de segregação na meiose I ou na meiose II [35]. Esta última dá origem à isodissomia [39], na qual a região afetada é geneticamente idêntica, resultando assim no desenvolvimento de diversas desordens genéticas pelo ganho ou perda de regiões cromossômicas, ou pela presença de duas cópias idênticas de genes anormais ou sequências de nucleotídeos [38]. Esse evento também ocorre em células somáticas, e recebe a nomenclatura de dissomia uniparental adquirida (UPDa). Nela, variantes genéticas adventícias são amplificadas e levam a uma vantagem de crescimento através da conversão de uma célula heterozigota em uma célula homozigota, sem alteração no número de cópias de DNA [35, 40,41,42,43,44,45,46]. Dois possíveis mecanismos podem levar à ocorrência de aUPD: (1) não disjunção das cromátides (são geradas células com o mesmo cromossomo originalmente duplicado); ou perda de cromossomos devido ao atraso na anáfase mitótica [39] e, na tentativa de compensar a perda de uma molécula cromossômica, é feita uma duplicação do cromossomo restante como molde, resultando em dois cromossomos idênticos. Outra possibilidade é (2) a troca recíproca de material cromossômico durante a mitose (recombinação mitótica), como as cromátides, gerando assim vários resultados possíveis [35,39] (**Figura 1**).



**Figura 1.** Mecanismos relacionados à dissomia uniparental adquirida em células-tronco pluripotentes hematopoiéticas. Este processo pode ocorrer devido a (1) (A) não disjunção das cromátides-irmãs ou (B) atraso na anáfase causando trissomia e monossomia de um dos cromossomos do conjunto, onde na célula com monossomia há duplicação do cromossomo remanescente na tentativa de equilibrar a perda de um cromossomo, o que resulta em dois cromossomos idênticos no mesmo célula; ou por (2) troca recíproca de material cromossômico durante a mitose (recombinação mitótica), como cromátides, que gera vários resultados possíveis. Neste exemplo, aplicado ao cromossoma 9, ilustra-se a presença do haplótipo 46/1 e da variante *JAK2V617F*, condicionada ao estado de homozigotia.

Também conhecida como perda neutra de heterozigidade do número de cópias (CNN-LOH) [47, 48], aUPD foi identificada pela primeira vez por Kralovics [41] em pacientes com PV e descreve uma recombinação mitótica associada à perda neutra de heterozigidade do cromossomo 9p [24]. Ao longo dos anos, essa anormalidade foi identificada em vários loci em uma variedade de neoplasias. Seu impacto é a conversão de variações genéticas para o estado homozigoto em genes essenciais, como *JAK2* e *CDKN2A* em 9p, *FLT3* em 13q, *TP53* em 17p e outros, incluindo *WT1*, *CBL*, *RUNX1* e *TET*, que estão relacionados com o processo inicial ou progressão dessas doenças [43]. No contexto das NMPs, mais especificamente na PV, esta



alteração revelou-se um achado comum, tal como em outras neoplasias hematológicas [35,39,43], e define o cenário molecular das NMPs [49], sendo relatada a variante *JAK2V617F* como presente na maioria dos pacientes com NMP [48,50].

## 2.2. Variante *JAK2V617F*

Descoberto em 2005 por Kralovics [48], a variante *JAK2V617F* (dbSNP ID: *rs77375493*) revolucionou o conhecimento genético e o diagnóstico de NMPs [51]. *JAK2V617F*, uma variante somática adquirida com ganho de função com troca de uma guanina (G) por timina (T) no nucleotídeo 1849 (c.1849G>T) do éxon 14 de *JAK2*, resulta na substituição entre valina (V) e fenilalanina (F) na posição 617 da cadeia polipeptídica, que afeta o domínio JH2 da proteína [27,31]. A variante afeta a atividade auto inibitória do JH2, resultando na ativação constitutiva do JH1 e, conseqüentemente, da via JAK-STAT, que interfere na sinalização intracelular [14]. *JAK2V617F* causa a transformação de células hematopoiéticas em crescimento independente de citocinas, promovendo assim tumorigênese, progressão tumoral e inflamação causada por estimulação contínua dentro da célula hematopoiética [17,26,52,53,54].

*JAK2V617F* é o evento genético mais comum em neoplasias mieloproliferativas negativas para *BCR-ABL1*. Está presente em >95% dos pacientes com PV e 50-60% dos pacientes com MFe TE [3,14,55,56] e é considerado um critério de diagnóstico pela OMS [5,7]. Pacientes com *JAK2V617F* negativo MFe ET podem ter outras alterações genéticas nos éxons 10 e 9 dos genes *MPL* e calreticulina (*CARL*), respectivamente [57,58,59]. Substituições de leucina por lisina no códon 539, deleções de ácido glutâmico no códon 543 e inserções que levam à substituição de fenilalanina no códon 547 já foram identificadas no éxon 12 do gene *JAK2* de pacientes com PV [51,60,61,62,63,64], o que demonstra a complexidade do cenário genético envolvido nos NMPs.

Diferentes estudos destacaram a origem de *JAK2V617F* em uma célula-tronco hematopoiética multipotente [29,50,65], que fornece uma vantagem seletiva sobre a célula hematopoiética multipotente normal e resulta em diferenciação mieloide e fenótipo mieloproliferativo [24,50]. Com isso, o clone mieloide anormal se prolifera e interrompe o microambiente medular, o que promove um nicho maligno que favorece as células-tronco com alterações genéticas em relação às normais e leva a uma eventual mobilização de células maduras para o sangue periférico. Isso explica a presença da variante em leucócitos na análise genética [50,54,65,66]. Além disso, a ativação da via JAK-STAT é mais evidente em pacientes

com alta carga do alelo variante *JAK2V617F*, demonstrando assim que existem diferenças na sinalização com base na presença de *JAK2V617F* heterozigoto ou homozigoto [24,55].

Aproximadamente um terço dos casos de PV e MF positivos para *JAK2V617F* são homozigotos com cargas alélicas variantes superiores a 50%, enquanto no TE é menor (aproximadamente 25%) e próximo a 100% em pacientes pós-PV ou pós-TE [14]. Na PV, os pacientes homozigotos têm uma duração mais longa da doença e um risco de progressão para mielofibrose [67]. A homozigose *JAK2V617F* é consequência da aUPD, que acompanha a variante e a reduz (e qualquer alelo que esteja em desequilíbrio de ligação) a um estado homozigoto, levando à duplicação do alelo mutado e consequente perda do alelo não mutado [38,45,47,67,68,69,70]. Essa relação entre os dois eventos (homozigosidade e aUPD) levanta a questão de como mecanismos genéticos distintos podem se correlacionar gradualmente para aumentar a dosagem alélica de uma variante genética de ganho de função conhecida em NMPs, com potencial para levar à transformação oncogênica de um câncer clonal pré-maligno agressivo, como uma transformação leucêmica [45].

Conforme descrito, *JAK2V617F* leva à proliferação clonal em NMPs; no entanto, não está claro quais fatores influenciam o desenvolvimento, a gravidade e o fenótipo da doença [66]. Esta última possivelmente está relacionada às características individuais (sexo, doença inflamatória associada) e anormalidades genéticas (genes condutores, variantes genéticas patogênicas e outras alterações cromossômicas) [71]. Diferentes vias de sinalização, modulação epigenética, sistema imunológico, estilo de vida, carga de alelos variantes *JAK2V617F* e alelos excepcionais de linhagem germinativa encontrados em casos hereditários e populacionais são outros possíveis fatores envolvidos no desenvolvimento de NMPs associados a *JAK2V617F* [71,72]. A descoberta dessa alteração genética trouxe benefícios para a terapia e diagnóstico dos NMPs; no entanto, algumas questões permanecem obscuras, como os eventos que antecedem sua aquisição, uma vez que não é uma variante genética germinativa [29]. Novas especulações surgiram com a descoberta do haplótipo 46/1, cujos estudos visam esclarecer a maioria dessas questões.

### 3. Haplótipo 46/1

Os seres humanos são organismos diploides com duas cópias de cada cromossomo, semelhantes entre si e diferem apenas em uma pequena fração de informação (0,1%) [73]. Essas diferenças estão contidas em locais de alterações genéticas de base única chamadas variantes de nucleotídeo único (SNVs), que contribuem para diferenças interindividuais e hereditárias em fenótipos complexos [74,75]. Um grupo de variações genéticas presentes no mesmo

cromossomo, que não são facilmente separáveis por recombinação e, portanto, tendem a ser herdadas juntas, é chamado de haplótipo [76].

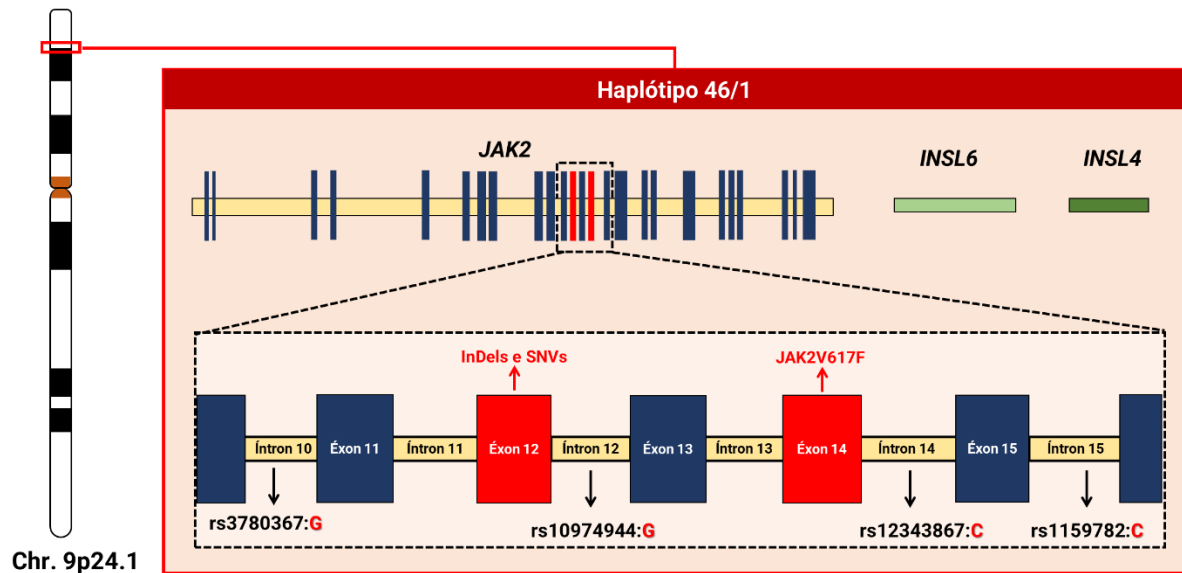
A maioria dessas variantes compõe um haplótipo e estão em desequilíbrio de ligação (LD), uma associação não aleatória de alelos em dois ou mais loci que existe devido à ancestralidade compartilhada de cromossomos contemporâneos [77]. Isso está relacionado ao tempo de eventos variantes e à distância genética e pode fornecer informações valiosas sobre a localização de variantes de doenças a partir de marcadores genéticos [77,78,79,80]. Os SNVs dentro de um bloco de haplótipos surgiram originalmente de um único evento histórico de variação genética e, portanto, estão associados a variantes intimamente relacionadas que estavam presentes no cromossomo ancestral no qual essas mudanças ocorreram [83]. Por esta razão, e outras razões, fortes associações estatísticas entre variantes genéticas são descritas, e a presença de uma variante particular em um local pode prever ou “marcar” a presença de uma variante específica em outro *locus* (carregando muita informação genética) [75].

Os haplótipos tornaram-se ferramentas úteis na investigação genética graças aos esforços estabelecidos pelo *HapMap International* [77,80,81,82] e pelo *1000 Genomes Project Consortium* [73,83,84]. Os dados obtidos dessas iniciativas podem ser usados para estudar migração humana, seleção evolutiva, estrutura populacional, imputação de regiões intrônicas e compreensão da associação genética entre variantes patológicas [85].

Entre 2008 e 2009, linhas de investigação envolvendo haplótipos e NMPs foram relatadas por diferentes grupos de pesquisa [86,87]. O haplótipo 46/1 foi o primeiro conjunto de variantes de risco germinativo descrito em NMP e um dos primeiros sinais de predisposição hereditária, também associado a casos de esplenomegalia, trombose venosa esplâncnica (TVS), aumento do hematócrito e síndrome de Budd-Chiari em pacientes positivos para *JAK2V617F* [88,89, 90,91], doença inflamatória intestinal [92], colite ulcerativa [93] e doença de Crohn em pacientes sem NMPs [93,94,95].

A nomenclatura desse haplótipo foi descrita pela primeira vez por Jones et al. [24], que observaram 109 casos de haplótipos idênticos do gene *JAK2* em 142 alelos quando a variante *JAK2V617F* estava presente. Como alelos residuais do tipo selvagem, o haplótipo foi identificado em apenas 12% dos casos. Essas proposições demonstraram que a perda da heterozigosidade de *JAK2V617F* não é aleatória e ocorre em um haplótipo específico de *JAK2*. Para ampliar a compreensão desses dados, Jones et al. [24] selecionaram 14 SNVs, o que resultou em 92 possíveis haplótipos. Destes, dois (números 46 e 1, referidos coletivamente como 46/1) eram idênticos e frequentes em pacientes positivos para *JAK2V617F* em comparação com os controles.

Composto por centenas de variantes, esse haplótipo se estende por um bloco de desequilíbrio de ligação com comprimento entre 250–280 Kb do cromossomo 9p.24.1, que engloba três genes: *JAK2*, *Insulin like 6* (*INSL6* —RefSeq.: NG\_046969.1; HGNC ID : 6089) e *Insulina tipo 4* (*INSL4* —RefSeq.: NC\_000009.12; HGNC ID: 6087); os dois últimos não são expressos no sistema hematopoiético [47,66,71,88,96] (Figura 2).



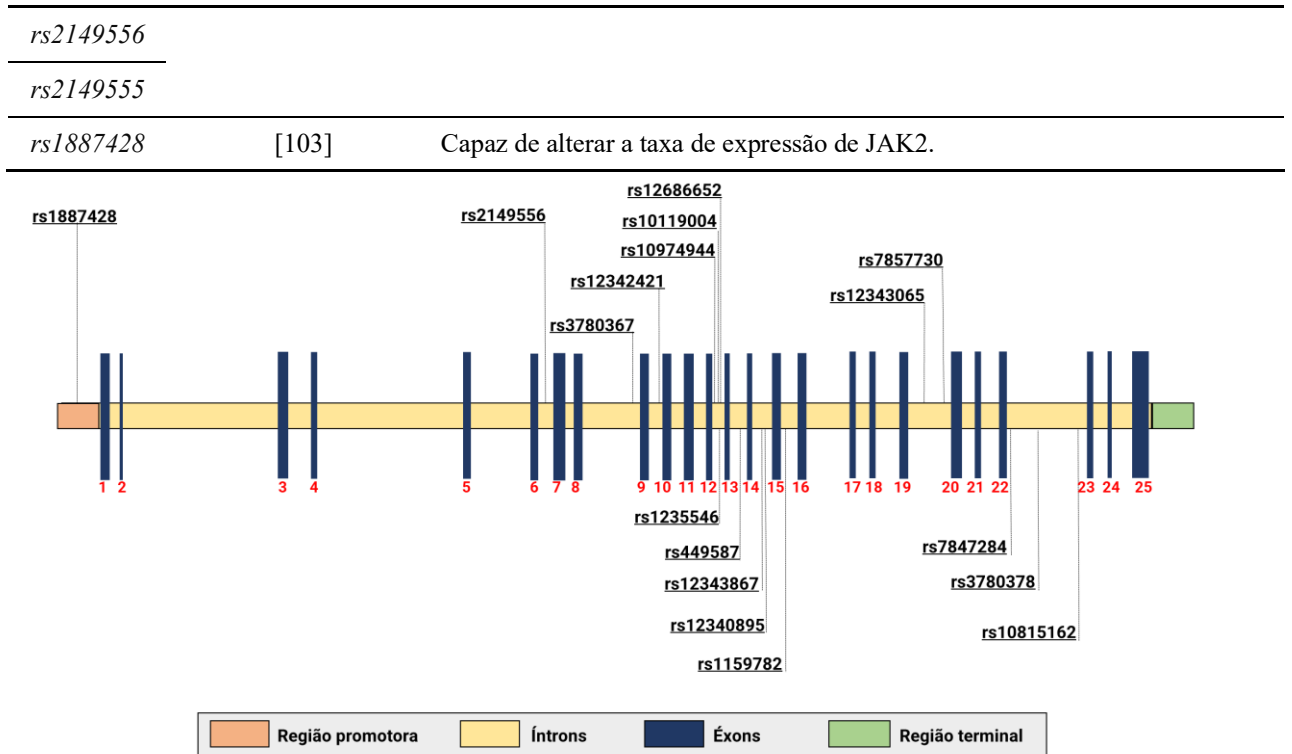
**Figura 2.** Representação esquemática do haplótipo 46/1 com base na sequência de referência do gene *JAK2* (NG\_009904). O haplótipo se estende por um bloco com aproximadamente 250–280 kb no cromossomo 9p, e engloba três genes (*JAK2*, *INSL6* e *INSL4*) e regiões com alto índice de variantes genéticas em *JAK2*, como o éxon 12 (com alterações como inserções, deleções e substituições) e éxon 14 (localização de *JAK2V617F*). Quatro variantes (rs3780367, rs10974944, rs12343867 e rs1159782) marcam o haplótipo e estabelecem outra nomenclatura baseada nos alelos variantes, GGCC, conforme também mencionado na literatura [97].

Diferentes SNVs foram mapeados, sendo a grande maioria identificada na Tabela 2 e na Figura 3. Alguns são usados para identificar o haplótipo 46/1. As alterações genéticas funcionam apenas como marcadores, e as verdadeiras variantes causais ainda permanecem pouco conhecidas ou totalmente escondidas no bloco LD [47]. Os seguintes quatro SNVs em LD são considerados os marcadores mais estudados do haplótipo: rs3780367 (NG\_009904.1:g.83511T>G), rs10974944 (NG\_009904.1:g.85587C>G), rs12343867 (NG\_009904.1:g.88945T>C) e rs1159782 (NG\_009904.1:g.92873T>C), que estão localizados nos íntrons 10, 12, 14 e 15, respectivamente. A frequência do alelo menor (MAF) [83] é mostrada na Figura 4. rs10974944 foi o primeiro a ser associado ao surgimento de NMPs [98]. Estudos realizados na Europa, Japão, China, América do Norte e Brasil mostraram que o alelo variante de rs10974944 (G) é mais frequente em todos os pacientes com NMP

(especialmente naqueles positivos para *JAK2V617F*) do que na população controle [68,76,89,98,99,100].

**Tabela 2.** Variantes de nucleotídeo único (SNVs) identificadas nos estudos do haplótipo 46/1 e suas respectivas informações descritas na literatura.

| SNV   | Referências       | Conclusões   |
|---|-------------------|--|
| <i>rs10974944</i>   | [68,76,89,97–102] | Estudos realizados em populações de origem brasileira, japonesa e chinesa; esta variante tem uma forte associação com pacientes com NMP positivo para <i>JAK2V617F</i> quando comparados aos controles; <i>rs10974944</i> (G) é um alelo de risco para NMPs. |
| <i>rs12686652</i><br><i>rs12335546</i>  | [89]              | Significativamente associado a pacientes com PV neste estudo de caso-controle, mas sem associação com NMPs na população japonesa.  |
| <i>rs12343867</i>   | [71,89,90,99–102] | Associado com <i>JAK2V617F</i> positivo nas populações do Japão, China e Taiwan, especialmente em indivíduos com PV; isso é usado como um marcador de haplótipo. Associação com esplenomegalia foi relatada e está em LD com outros SNVs do haplótipo 46/1.  |
| <i>rs4495487</i>  | [89]              | Mais frequente em pacientes com PV em um estudo de caso-controle no Japão. Não foi relatado em populações caucasianas e pode contribuir para o fenótipo NMP na população japonesa.   |
| <i>rs691857</i><br><i>rs17803986</i><br><i>rs7848509</i><br><i>rs10758677</i> | [101]             | Nenhuma associação significativa.  |
| <i>rs3780367</i>  | [103,104]         | Em desequilíbrio de ligação com outros marcadores do haplótipo e tem associação significativa com NMPs, mas sem dados populacionais.   |
| <i>rs12340895</i>   | [100]             | Associado a NMPs <i>JAK2V617F</i> positivos em pacientes chineses.   |
| <i>rs12342421</i>   | [100]             | Associado à predisposição para desenvolver NMPs <i>JAK2V617F</i> positivos (OR = 3,55) em portadores do alelo menor C (em populações chinesas) com risco aumentado de 250% para a doença, independentemente do haplótipo 46/1.                               |
| <i>rs1159782</i><br><i>rs10119004</i><br><i>rs12343065</i>                    | [99,104]          | Está em desequilíbrio de ligação com marcadores do haplótipo 46/1.   |
| <i>rs10815162</i><br><i>rs7857730</i><br><i>rs7847294</i><br><i>rs3780378</i> | [100]             | Associado com <i>JAK2V617F</i> positivo e relatado pela primeira vez no mesmo estudo.  |



**Figura 3.** Localização das variantes identificadas nos estudos direcionados ao haplótipo 46/1. O mapeamento das variantes ao longo do gene foi realizado com base na sequência de referência (NG\_009904).



**Figura 4.** Frequência de alelos menores (MAF) dos marcadores de haplótipo 46/1. As frequências foram medidas a partir de amostras coletadas de indivíduos de Porto Rico, Colômbia, Peru, Gâmbia, Nigéria, Quênia, Itália, França, Reino Unido, Finlândia, Paquistão, Índia, China, Japão e de origem mexicana residentes na Califórnia e Texas (Estados Unidos) [104,105,106,107,108].

A variante *rs10119004* (NG\_009904.1:g.:85805G>A; MAF de G: 38%), localizada próxima a *rs10974944*, foi citada em estudos envolvendo NMPs e foi associada a NMPs na população chinesa [100].

Existe uma ampla discussão acadêmico-científica a respeito das variantes presentes no haplótipo, e essas alterações genéticas não podem ser consideradas como a única causa da proliferação clonal, pois, para o desenvolvimento de um NMP, há a necessidade de aquisição de variantes somáticas adicionais, como a variante *JAK2V617F* [47]. Portanto, 46/1 é descrito como um dos possíveis eventos “pré-*JAK2V617F*”, que é um fator de predisposição fortemente ligado a chances três a quatro vezes maiores de desenvolvimento de NMPs e responsável por metade do risco de NMPs atribuíveis a fatores herdados [69 , 109 , 110 , 111].

#### **4. Associação entre o haplótipo 46/1 e a variante *JAK2V617F***

A aquisição de variantes somáticas é um mecanismo patogênico de grande importância no desenvolvimento dos NMPs, e fatores genéticos antecedentes também desempenham um papel importante em seu desenvolvimento [89]. No contexto dessas malignidades hematológicas, uma possível associação entre o haplótipo 46/1 e a variante *JAK2V617F* foi descrita, por exemplo, no estudo realizado por Kilpivaara [98], que identificou (1) a variante *rs10974944* (C/ G) no gene *JAK2*, que predispõe o desenvolvimento de NMPs *JAK2V617F* positivas, (2) três *loci* modificadores de NMP desconhecidos no momento do estudo, e relataram que (3) a aquisição de *JAK2V617F* é preferencialmente adquirida em *cis* com o alelo predisponente e que (4) *rs10974944* e *JAK2V617F* estão localizados em um bloco de haplótipo comum que não abrange o promotor *JAK2* 5' (eles não estão em LD [101]), portanto, o alelo *rs10974944* (G) pode predispor a variante somática *JAK2V617F* na mesma cadeia [98].

Da mesma forma, os achados germinativos identificados suportam a hipótese de que 46/1 contribui para a predisposição de NMPs. Esses achados estão de acordo com os relatos de Olcaydu [101], nos quais o haplótipo *rs3780367G/rs10974944G/rs12343867C/rs1159782C* foi fortemente associado ao *JAK2V617F* [101].

#### **Concordância do haplótipo 46/1 com *JAK2V617F* em diferentes populações**

Estudos anteriores relataram a associação de variantes do haplótipo 46/1 com *JAK2V617F* em populações etnicamente distintas. Em um estudo realizado na China, foi descrita associação significativa entre a variante *JAK2V617F* e o *rs10974944* (G) do haplótipo 46/1, sendo observada maior frequência em pacientes após comparação com controles [68]. Resultados semelhantes foram observados no Japão por Ohyashiki [89], que avaliou 138 pacientes e 107 indivíduos saudáveis com idades entre 30 e 87 anos e destacou o status *JAK2V617F* nos pacientes (68,8% *JAK2V617F* positivo) e 107 indivíduos controle. Assim, a combinação do alelo G em *rs10974944*, alelo C em *rs4495487* e alelo C em *rs12343867* foi

fortemente associada a NMP *JAK2V617F* positivo (OR: 3,07; 95% CI: 1,73–5,46) e discretamente associada a NMP *JAK2V617F* negativo (OR: 2,26, IC 95%: 1,01–4,7) quando comparado aos controles. Isso demonstra que os portadores de 46/1 têm um risco aumentado de 200 a 300% (2 a 3 vezes mais provável) de adquirir *JAK2V617F* quando comparados aos não portadores. Esses achados estão de acordo com os de Tefferi [69], Triffa [112], Jones [24], Kilpivaara [98], Olcaydu [101], Pardanani [87] e Wang [45] que realizaram estudos com populações caucasianas dos Estados Unidos da América e de vários países europeus.

Outro estudo realizado na China avaliou um SNV em DL (rs12340895) com haplótipo 46/1 em 225 pacientes e 226 controles, pois foi identificado como fator de risco para NMPs, bem como homozigose no *locus* rs12340895 como fator de suscetibilidade para *JAK2V617F* [113]. Resultados semelhantes foram encontrados na população de Taiwan com marcador SNV rs1234387 [90]. Os diferentes relatos em diferentes populações ao redor do mundo destacam que o mecanismo subjacente à aquisição de *JAK2V617F* não se limita apenas aos caucasianos; portanto, deve ter uma base evolutiva relativamente antiga [47].

Existem duas hipóteses que poderiam explicar a associação entre o haplótipo 46/1 e a variante *JAK2V617F*: hipermutabilidade e hipótese do solo fértil [24,45,114]. A hipótese da hipermutabilidade considera o 46/1 como mais instável geneticamente [68], podendo levar a danos no DNA e erros de replicação [88] por predispor à aquisição de *JAK2V617F* com mais frequência quando comparado a outros haplótipos [96]. O suporte para esta hipótese vem da observação de que *JAK2V617F* aparentemente apareceu pelo menos duas vezes em alguns indivíduos, e possivelmente porque as variantes do éxon 12 estão associadas com 46/1, embora com um risco menor [47,115]. Por outro lado, a hipótese do solo fértil assume que as células-tronco hematopoiéticas que carregam 46/1 têm uma vantagem seletiva quando ocorrem variantes oncogênicas [96,99]. Mesmo com proposições diferentes, uma hipótese não anula a outra e ambas podem coexistir no cenário genético dessas neoplasias [76].

## **5. Contribuição de 46/1 para a Desregulação Inflamatória em NMPs**

As células-tronco hematopoiéticas requerem um conjunto de interações cooperativas estritamente reguladas e conservadas com suas células estromais, a fim de realizar os processos normais de dormência, autorrenovação, proliferação, locomoção e diferenciação. Estes dependem da expressão de genes hematopoiéticos, interação entre células, produção e liberação de uma variedade de citocinas e quimiocinas [116] relacionadas aos mecanismos inflamatórios envolvidos nos NMPs. Em nossa revisão anterior, identificamos que a variante *JAK2V617F*

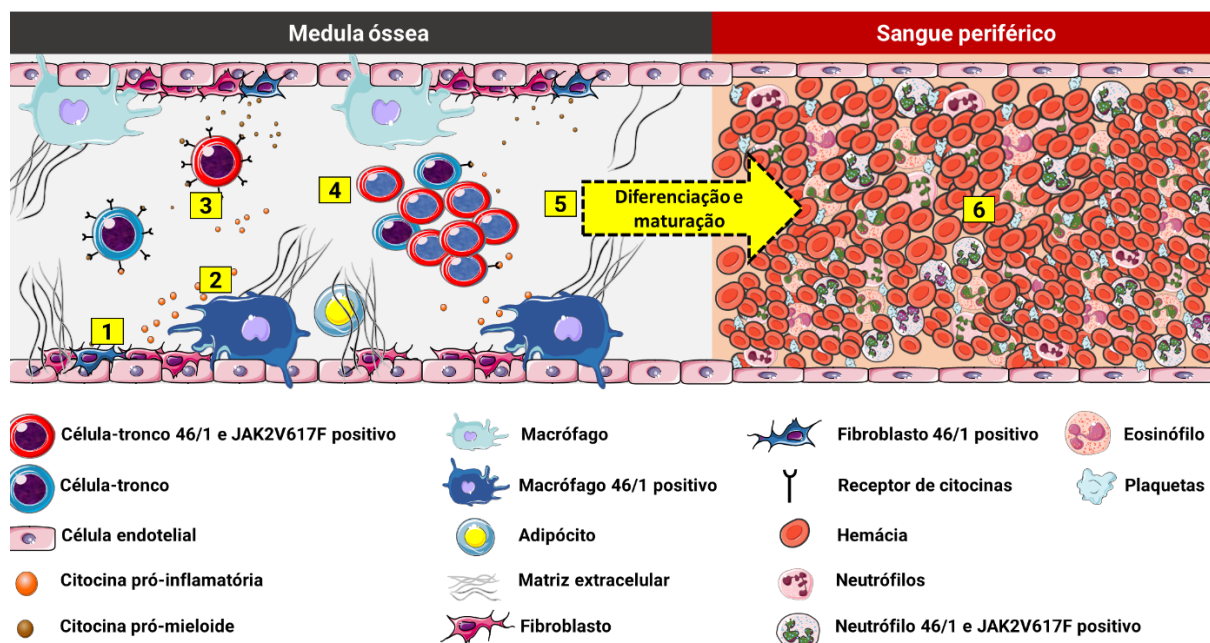


desempenha um papel relevante nesse complexo processo, interferindo na regulação de várias vias envolvidas na produção de citocinas, tumorigênese e mediadores da inflamação [56].

Estudos sugerem que o haplótipo está relacionado a uma expressão elevada de *JAK2*, *INSL6* e *INSL4*, que causa recombinação do DNA, surgimento de variações genéticas ou metilação anormal da região promotora [97,117]. Hermouet [97] sugere que 46/1 pode incluir sequências de DNA repetitivas intrônicas não identificadas que facilitam a recombinação do DNA e a superexpressão do gene *JAK2* localizado no alelo recombinado. Nesse contexto, *JAK2* transmite os sinais de proliferação de todas as citocinas críticas para a mielopoiese, e o haplótipo 46/1 predisporia os portadores à estimulação cronicamente excessiva da mielopoiese. Isso expõe os progenitores mieloides a um processo mitótico exacerbado e aumenta o risco de erro e alteração nos genes direcionados à mielopoiese, como *JAK2* e *MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *LNK*, *CBL* e *EZH2* [97]. Um estudo mostrou que pacientes positivos para NMP apresentam alta expressão de mRNA de *JAK2*, o que estaria relacionado a uma maior probabilidade de células mieloides se dividirem em resposta às citocinas ativadoras de proteínas, tornando-as, assim, propensas a erros de replicação [97]. Além disso, o haplótipo pode, em teoria, contribuir para uma sinalização preponderante a jusante de *JAK2V617F* ativado constitutivamente por meio do aumento da produção de citocinas pelas células do estroma da medula óssea, possivelmente mediado por *INSL4* e *INSL6* [71,97,117]. Este último já foi relatado como sendo expresso em células estromais medulares de ratos [118].

O haplótipo também pode influenciar na aquisição de variantes somáticas em *JAK2*, bem como facilitar a expressão de *INSL6* e *INSL4* em células do estroma medular, o que leva à sinalização anormal de citocinas com ação pró-inflamatória e promieloide, e gera um ambiente favorável para o clone mutante (Figura 5). Não se sabe ao certo quais citocinas estariam relacionadas; no entanto, vários estudos clínicos com pacientes com NMP já demonstraram níveis plasmáticos aumentados de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e fatores de crescimento, incluindo fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [119,120]. Na MFP, níveis celulares e extracelulares de várias citocinas com ação angiogênica e fibrinogênica, como fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), estão aumentados, entre outros que condicionam o estroma medular a criar um microambiente patológico favorável que nutre e protege as células malignas através de alterações histológicas da medula óssea [121,122]. Pode-se levantar a hipótese de que o haplótipo atue como um possível fator na suscetibilidade

genética do hospedeiro a uma resposta mieloide inadequada às citocinas, levando assim a um estado inflamatório intensificado e aumento do risco de neoplasias mielóides, que é acelerado pela aquisição de genes somáticos variantes [9,117].



**Figura 5.** Possível associação do haplótipo 46/1 e NMPs. (1) Células estromais medulares positivas para 46/1 podem apresentar desregulação em genes, como *INSL4* e *INSL6*, que podem estar envolvidos na (2) produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios e promielóides. Essas citocinas (3) interagem com células-tronco normais e haplótipo-positivas e multipotentes *JAK2V617F*, promovendo (4) proliferação exacerbada (vantagem proliferativa) das células mutantes, que, por sua vez, continuam seu processo de (5) diferenciação e maturação celular, e desencadear o (6) distúrbio mieloproliferativo clonal.

## 6. Características clínicas e laboratoriais dos NMPs relacionados ao haplótipo 46/1

A relação entre *JAK2V617F* e o haplótipo 46/1 é clara e tem sido apontada pela maioria dos estudos, principalmente em pacientes com PV. Esta questão foi confirmada por Ohyashiki [89], que identificou uma maior presença de variantes de haplótipos, níveis de hemoglobina significativamente elevados em pacientes com *JAK2V617F* e genótipo GCC em comparação com aqueles com genótipo GCC, mas sem *JAK2V617F*. Também é interessante notar que alguns estudos associam o haplótipo a certos achados clínicos (esplenomegalia, trombose da veia esplâncnica e síndrome de Budd-Chiari) e achados laboratoriais (aumento da contagem de plaquetas, leucócitos, hematócrito e hemoglobina) que são característicos de NMPs [86,90,91,99,123,124]; no entanto, essa correlação não é um consenso [96,125]. Mesmo assim, não se pode ignorar que a hemoglobina e o hematócrito podem estar alterados para níveis acima do normal em casos de homozigose e alta carga do alelo variante para *JAK2V617F* [125]; e este último já demonstrou estar relacionado com 46/1 em vários estudos [86,125].

Conforme discutido anteriormente nesta revisão, a homozigose para a variante somática está relacionada a aUPD que, por sua vez, pode ser causada por 46/1 devido à combinação de grandes porções das duas regiões parentais do cromossomo 9p [96], ou seja, esses três elementos (aUPD + HAPLÓTIPO 46/1 + *JAK2V617F*), em teoria, trabalham juntos para estabelecer o fenótipo mieloproliferativo e hereditário dos NMPs. No caso desta última, mais especificamente sobre a herdabilidade das variantes, acredita-se que um alelo marcador situado no mesmo haplótipo de um alelo causador (*JAK2V617F*) provavelmente será herdado em conjunto, o que não seria possível se os alelos estivessem em diferentes haplótipos [126].

### **7. Herança de NMPs e a Relação com o Haplótipo 46/1**

O desenvolvimento de uma neoplasia hematológica depende de vários fatores, como idade, ambiente e genética do hospedeiro [46]. Fatores genéticos hereditários alteram o risco em cada estágio do desenvolvimento, ou seja, desde a aquisição do câncer até sua progressão [46,127]. As formas hereditárias de NMPs podem ser divididas em duas categorias principais: (1) síndromes hereditárias que afetam uma única linhagem com herança mendeliana, alta penetrância e hematopoiese policlonal; e (2) predisposição hereditária para verdadeiros NMPs, que são caracterizados por baixa penetrância, hematopoiese clonal, presença de variantes somáticas (por exemplo, *JAK2V617F*) e risco de progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) [46,128].

Na predisposição hereditária, existe a possibilidade de ocorrência em dois ou mais membros da mesma família e, neste contexto, o termo “familiar” é utilizado para descrever uma alteração desconhecida da linhagem germinativa que predispõe a aquisição de um NMP [46]. Um estudo familiar de mais de 11.000 pacientes com NMPs e seus quase 25.000 parentes de primeiro grau encontrou um risco 5 a 7 vezes maior de desenvolver NMPs entre parentes de primeiro grau de pacientes com NMPs [70]. Outra pesquisa, realizada com 72 famílias, caracterizou 50% dos indivíduos incluídos no estudo com padrão de herança compatível com dominância autossômica com penetrância incompleta [54].

Há evidências crescentes que sugerem que fatores hereditários são responsáveis por um efeito mais amplo na suscetibilidade ao desenvolvimento de NMPs [47,129]. Variantes somáticas observadas em NMPs familiares são responsáveis pela vantagem proliferativa e subsequente clonalidade celular, enquanto o componente herdado predispõe à aquisição de variações genéticas somáticas [46,130]. No entanto, existem estudos que discordam dessa relação direta e apontam que outros fatores, além do haplótipo, explicariam a herança dos NMPs [44,46,109,115], como, por exemplo, a interação com o alelo rs2736100 (C) do *TERT*, que é

significativamente encontrado em NMPs familiares quando comparados a NMPs esporádicos [131]. Mesmo que essa parcela discorde das proposições feitas, avaliar as variantes que fazem parte do haplótipo germinativo 46/1 em casos familiares torna-se relevante para entender seu comportamento dentro do cenário de hereditariedade e sua possível relação com os NMPs familiares.

## 8. Conclusões e Perspectivas

É notável que o cenário genético dos NMPs é complexo e ainda em fase de elucidação. O haplótipo 46/1 é um achado importante nesse processo de descoberta, principalmente por sua relação com a variante *JAK2V617F*, e inserções e deleções do éxon 12 de *JAK2* [88]. Há também uma possível associação com variantes do éxon 10 do gene *MPL* [132], e isso ainda está em discussão [133,134], bem como com o gene *CALR* [135,136]. Considerando o haplótipo como objeto de análise, não se pode descartar a complexidade de se estudar a região em que ele está localizado, pois, além de ser consideravelmente extensa, possui centenas de SNVs em LD que se localizam nas regiões intrônicas pouco estudadas. No entanto, seria ingênuo inferir que dentro desta região apenas uma variante seria germinativa e responsável pela positividade de *JAK2V617F* ou hereditariedade de NMPs.

Curiosamente, algumas das associações com 46/1 descritas até agora envolvem patologias acentuadas ou caracterizadas por desregulação inflamatória: NMPs, LMA, doença de Chron, doença inflamatória intestinal e colite ulcerativa. Essas relações provavelmente não são aleatórias e apoiam ainda mais a hipótese de que o haplótipo 46/1 pode estar associado a *JAK2V617F* e/ou outras variantes funcionais do gene *JAK2* que ainda não foram descritas e que desempenham um papel na desregulação inflamatória [117].

O haplótipo 46/1 pode até se estabelecer como uma alternativa viável para o monitoramento de indivíduos com NMPs e outras neoplasias mieloides. Tal indicação é considerada por sua associação com menor sobrevida em pacientes com MF devido à diminuição da defesa contra infecções e aumento do risco de uma resposta inflamatória mais grave, que, por sua vez, contribui para a remodelação tecidual na medula óssea, levando, assim, a uma transformação mielofibrótica [24,56,58,97,137]; com a alta carga alélica variante relacionada a um fenótipo NMP mais grave; aumento do risco de transformação mielofibrótica em pacientes com PV [69]; e por ser um possível fator relacionado à LMA com cariótipo normal associado à predisposição para uma forma mielomonocítica aguda, o que a torna um fator de risco independente desfavorável [117].

Outra associação relatada seria com a doença aguda do enxerto contra o hospedeiro (aGvHD) graus II-IV em pacientes com LMA submetidos a transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (alo-HSCT) [138]. Tanto este quanto os demais estudos citados devem ter seus dados confirmados por outros estudos com populações maiores e mais heterogêneas, a fim de verificar a relação dessas variantes germinativas com os NMPs e outras neoplasias mieloides. É por meio dessas confirmações que tais variantes podem se tornar úteis na prática clínica para obtenção de resultados terapêuticos satisfatórios, como já é o caso dos haplótipos relacionados ao antígeno leucocitário humano (HLA) [139].

A utilização do 46/1 em testes de triagem ou preditivos em casos de NMPs familiares pode ser uma alternativa a ser considerada. Mesmo que não haja consenso sobre o impacto do haplótipo em casos familiares, sua existência e relação não podem ser descartadas. A investigação dessas variantes torna-se relevante devido aos achados descritos até o momento e à associação entre idade precoce ao diagnóstico em NMPs familiares [140] e casos de TE na infância já relatados na literatura [141]. Os achados dessas análises podem ser úteis para verificar a probabilidade do indivíduo ser portador de um traço hereditário, que pode ou não ser patogênico [142], a fim de traçar o perfil molecular dos casos infantis (a composição genética na infância TE pode ser mais complexa do que nos adultos) [141]. Além disso, permite prever a suscetibilidade a doenças, favorecendo o diagnóstico precoce para estratégias preventivas e terapias personalizadas [143,144]. A análise de variantes de haplótipos em pacientes triplo negativos (que não possuem variantes driver nos genes *MPL*, *JAK2* e *CARL*) também pode ser útil nesse contexto investigativo de NMPs. Conforme estabelecido pela OMS, esses pacientes devem ser testados para outras variantes em genes adicionais, como *ASXL1*, *DNMT3A*, *TET2*, *EZH2*, *IDH1/2* e *SRSF2*, a fim de verificar a natureza do distúrbio mieloproliferativo clonal [52]. A inclusão do haplótipo nessa análise de triagem ajudaria a compreender melhor o cenário genético desses pacientes, a fim de verificar se as variantes germinativas estão envolvidas nesses mecanismos e interagem com outras variantes genéticas ainda não conhecidas, além de comprovar ou refutar sua ação no contexto da desregulação da inflamação nesses casos. A utilização do sequenciamento de próxima geração (NGS) seria uma alternativa valiosa nesse processo, podendo auxiliar na confirmação desse diagnóstico [145]. Também permitiria a avaliação simultânea da complexidade molecular da doença com maior abrangência e sensibilidade, além de menores custos [52].

Diagnósticos e prognósticos baseados em análise de DNA aplicados à dinâmica clínica de pacientes com câncer estão em constante expansão e nos ajudam a entender a complexidade dos genomas do câncer [85,88,146,147]. Embora, atualmente, tenhamos conhecimento limitado

sobre as interações haplótipo-fenótipo de genes envolvidos em NMPs. A continuidade das pesquisas sobre esse tema, em diferentes populações ao redor do mundo e com diferentes associações clínicas e laboratoriais, auxiliará no melhor entendimento do real impacto do 46/1 na dinâmica mieloproliferativa. Os resultados desses estudos podem produzir ferramentas úteis no diagnóstico, acompanhamento personalizado, aconselhamento genético e treinamento do médico para a tomada de decisão sobre o planejamento e escolha do tratamento do paciente, melhorando assim não só a sobrevida, mas também a qualidade de vida do paciente.

### **Contribuições do autor**

Conceituação: JP e LPdSM; redação—preparação do rascunho original: JP; redação—revisão e edição: JP, GAVS, LPdSM e AMT. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

### **Financiamento**

Este trabalho foi financiado pelo Programa Pró-Estado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) — nº 002/2008, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) nº 007/2018 e nº 005/2019; Programa POSGRAD—#005/2022, Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

### **Declaração do Conselho de Revisão Institucional**

Não aplicável.

### **Declaração de Consentimento Informado**

Não aplicável.

### **Declaração de Disponibilidade de Dados**

Não aplicável.

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### **Referências**

1. Bao, E.L.; Nandakumar, S.K.; Liao, X.; Bick, A.G.; Karjalainen, J.; Tabaka, M.; Gan, O.I.; Havulinna, A.; Kiiskinen, T.; Lareau, A.; et al. Inherited myeloproliferative neoplasm risk impacts hematopoietic stem cells. *Nature* 2021, 586, 769–775. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2786-7>.Inherited.

2. Harrison, C.N.; Koschmieder, S.; Foltz, L.; Guglielmelli, P.; Flindt, T.; Koehler, M.; Mathias, J.; Komatsu, N.; Boothroyd, R.N.; Spierer, A.; et al. The impact of myeloproliferative neoplasms (NMPs) on patient quality of life and productivity: Results from the international NMP Landmark survey. *Ann. Hematol.* 2017, 96, 1653–1665. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3082-y>.
3. Zerbini, M.C.N.; Soares, F.A.; Morais, J.C.; Vassallo, J.; Pereira Velloso, E.D.R.; De Lourdes, L.F.; Chauffaille, M.; Chiattonne, C.S.; Aldred, V.L.; Siqueira, S.A.C.; et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: Padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4a edição. *J. Bras. Patol. E Med. Lab.* 2011, 47, 643–648. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000600011>.
4. Abello, V.; Quintero, G.; Espinosa, D.; Solano, M.H.; Casas, C.P.; Saavedra, D.; Quintero, M.; Lobatón, J.F.; Sossa, C.; Peña, Á.; et al. Descripción de las características clínicas de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC) Description of the clinical characteristics of chronic myeloproliferative neoplasms (NMPs) First report of the colombian registry of NMPs. *Acta Médica Colomb.* 2017, 42, 35–41.
5. Swerdlow, S.H.; Campo, E.; Harris, N.L.; Jaffe, E.S.; Pileri, S.A.; Stein, H.; Thiele, J. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014; ISBN 9789283224358.
6. Cree, I.A. The WHO classification of haematolymphoid tumours. *Leukemia* 2022, 36, 1701–1702. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01625-x>.
7. Khoury, J.D.; Solary, E.; Abal, O.; Akkari, Y.; Alaggio, R.; Apperley, J.F.; Bejar, R.; Berti, E.; Busque, L.; Chan, J.K.C.; et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: Myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia* 2022, 36, 1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.
8. Bao, E.L.; Cheng, A.N.; Sankaran, V.G. The genetics of human hematopoiesis and its disruption in disease. *EMBO Mol. Med.* 2019, 11, e10316. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910316>.
9. Spivak, J. Myeloproliferative neoplasms. *Diagn. Histopathol.* 2017, 27, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2021.06.003>.
10. Baade, P.D.; Ross, D.M.; Anderson, L.A.; Forsyth, C.; Fritschi, L. Changing incidence of myeloproliferative neoplasms in Australia, 2003–2014. *Am. J. Hematol.* 2019, 94, E107–E109. <https://doi.org/10.1002/ajh.25407>.
11. Shallis, R.M.; Wang, R.; Davidoff, A.; Ma, X.; Podoltsev, N.A.; Zeidan, A.M. Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. *Blood Rev.* 2020, 42, 100706. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100706>.
12. Roaldsnes, C.; Holst, R.; Frederiksen, H.; Ghanima, W. Myeloproliferative neoplasms: Trends in incidence, prevalence and survival in Norway. *Eur. J. Haematol.* 2017, 98, 85–93. <https://doi.org/10.1111/ejh.12788>.
13. Lim, Y.; Lee, J.O.; Bang, S.M. Incidence, survival and prevalence statistics of classical myeloproliferative neoplasm in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 2016, 31, 1579–1585. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.10.1579>.
14. Jang, M.A.; Choi, C.W. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean J. Intern. Med.* 2020, 35, 1–11. <https://doi.org/10.3904/kjim.2019.317>.
15. Varghese, C.; Immanuel, T.; Ruskova, A.; Theakston, E.; Kalev-Zylinska, M.L. The epidemiology of myeloproliferative neoplasms in new zealand between 2010 and 2017: Insights from the new zealand cancer registry. *Curr. Oncol.* 2021, 28, 1544–1557. <https://doi.org/10.3390/curroncol28020146>.
16. Shallis, R.M.; Zeidan, A.M.; Wang, R.; Podoltsev, N.A. Epidemiology of the philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2021, 35, 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.11.005>.
17. Jimenez, S. Neoplasias mieloproliferativas Myeloproliferative neoplasms. *Acta Médica Colomb.* 2017, 42, 15–17.
18. Lima, J.G.; Lopes, R.; Barbieri, 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. *Arq. Catarin. Med.* 2018, 34, 128–139.
19. Chauffaille, M. de L.L.F. Neoplasias mieloproliferativas: Revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010, 32, 308–316. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000091>.
20. Szuber, N.; Vallapureddy, R.R.; Penna, D.; Lasho, T.L.; Finke, C.; Hanson, C.A.; Ketterling, R.P.; Pardanani, 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. <https://doi.org/10.1002/ajh.25270>.
21. Vainchenker, W.; Kralovics, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017, 129, 667–679. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-695940>.
22. Vainchenker, W.; Constantinescu, S.N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* 2013, 32, 2601–2613. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.347>.

23. Morris, R.; Kershaw, N.J.; Babon, J.J. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Sci.* 2018, 27, 1984–2009. <https://doi.org/10.1002/pro.3519>.
24. Jones, A.V.; Chase, A.; Silver, R.T.; Oscier, D.; Zoi, K.; Wang, Y.L.; Cario, H.; Pahl, H.L.; Collins, A.; Reiter, A.; et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009, 41, 446–449. <https://doi.org/10.1038/ng.334>.
25. Burja, B.; Mertelj, T.; Frank-Bertoncelj, M. Hi-JAKi-ng synovial fibroblasts in inflammatory arthritis with JAK inhibitors. *Front. Med.* 2020, 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00124>.
26. Gerds, A.T. Beyond JAK-STAT: Novel therapeutic targets in Ph-negative NMP. *Am. Soc. Hematol. Educ. Progr. Book* 2019, 2016, 407–414.
27. Quintás-Cardama, A.; Verstovsek, S. Molecular pathways: JAK/STAT pathway: Mutations, inhibitors, and resistance. *Clin. Cancer Res.* 2013, 19, 1933–1940. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0284>.
28. Levine, R.L.; Gilliland, D.G. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008, 112, 2190–2198. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-077966>.
29. Levine, R.L.; Pardanani, A.; Tefferi, A.; Gilliland, D.G. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat. Rev. Cancer* 2007, 7, 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrc2210>.
30. National Center for Biotechnology Information. Homo Sapiens Janus Kinase 2 (JAK2), RefSeqGene (LRG\_612) on Chromosome 9. Available online: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_009904.1?from=5001&to=147939&report=genbank](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_009904.1?from=5001&to=147939&report=genbank) (accessed on 9 February 2022).
31. Catarsi, P.; Rosti, V.; Morreale, G.; Poletto, V.; Villani, L.; Bertorelli, R.; Pedrazzini, M.; Zorzetto, M.; Barosi, G. JAK2 exon 14 skipping in patients with primary myelofibrosis: A minor splice variant modulated by the JAK2-V617F allele burden. *PLoS ONE* 2015, 10, e0116636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116636>.
32. Santos, L.C.d. Estudo Citogenético E Pesquisa De Mutações Nos Genes JAK2 E MPL Em Policitemia Vera , Mielofibrose Primária e Trombocitemia Essencial; Universidade Federal de São Paulo: São Paulo, Brazil, 2010; p. 70.
33. Freitas, M.C.d.S. Avaliação Do Papel da Proteína Tirosina-Kinase Janus Kinase 2 (jak-2) Em Modelo Murino de Lesão Hepática Induzida Por Isquemia De Perfusão; Universidade Federal de São Paulo: São Paulo, Brazil, 2010; Volume 2.
34. 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. <https://doi.org/10.1042/BJ20090615>.
35. Score, J.; Cross, N.C.P. Acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2012, 26, 981–991. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2012.07.002>.
36. Nangalia, J.; Green, A.R. Myeloproliferative neoplasms: From origins to outcomes. *Blood* 2017, 130, 2475–2483. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-782037>.
37. Engel, E. A new genetic concept: Uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am. J. Med. Genet.* 1980, 6, 137–143. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320060207>.
38. Erola, P.; Torabi, K.; Miró, R.; Camps, J. The non-random landscape of somatically-acquired uniparental disomy in cancer. *Oncotarget* 2019, 10, 3982–3984. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26987>.
39. Makishima, H.; Maciejewski, J.P. Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2011, 17, 3913–3923. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2900>.
40. Kralovics, R.; Buser, A.S.; Teo, S.S.; Coers, J.; Tichelli, A.; Van der Maas, A.P.C. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2003, 102, 1869–1871. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0744>. Supported.
41. Kralovics, R.; Guan, Y.; Prchal, J.T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* 2002, 30, 229–236. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00789-5](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00789-5).
42. Song, J.; Shao, H. SNP array in hematopoietic neoplasms: A review. *Microarrays* 2015, 5, 1. <https://doi.org/10.3390/microarrays5010001>.
43. Wang, L.; Wheeler, D.A.; Prchal, J.T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p in hematologic malignancies. *Exp. Hematol.* 2016, 44, 644–652. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.11.005>.
44. Zoi, K.; Cross, N.C.P. Genomics of myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Oncol.* 2017, 35, 947–954. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7968>.
45. Wang, K.; Swierczek, S.; Hickman, K.; Prchal, J.T.; Hakonarson, H. Convergent mechanisms of somatic mutations in polycythemia vera. *Physiol. Behav.* 2011, 12, 25–32.
46. Braunstein, E.M.; Moliterno, A.R. Back to biology: New insights on inheritance in myeloproliferative disorders. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2014, 9, 311–318. <https://doi.org/10.1007/s11899-014-0232-3>.



47. Jones, A.V.; Cross, N.C.P. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther. Adv. Hematol.* 2013, 4, 237–253. <https://doi.org/10.1177/2040620713489144>.
48. 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. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051113>.
49. Palomo, L.; Acha, P. Genetic aspects of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Cancers* 2021, 3, 2120. <https://doi.org/10.3390/cancers13092120>.
50. Mead, A.J.; Mullally, A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood* 2017, 129, 1607–1616. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696005>.
51. Viny, A.D.; Levine, R.L. Genetics of myeloproliferative neoplasms. *Cancer J.* 2014, 20, 61–65. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000013>.
52. Skov, V. Next generation sequencing in NMPs. Lessons from the past and prospects for use as predictors of prognosis and treatment responses. *Cancers* 2020, 12, 2194.
53. Staerk, J.; Constantinescu, S.N. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. *JAK-STAT* 2012, 1, 184–190. <https://doi.org/10.4161/jkst.22071>.
54. Bellané-Chantelot, C.; Chaumarel, I.; Labopin, M.; Bellanger, F.; Barbu, V.; De Toma, C.; Delhommeau, F.; Casadevall, N.; Vainchenker, W.; Thomas, G.; et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006, 108, 346–352. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4852>.
55. Rampal, R.; Al-Shahrour, F.; Abdel-Wahab, O.; Patel, J.P.; Brunel, J.P.; Mermel, C.H.; Bass, A.J.; Pretz, J.; Ahn, J.; Hricik, T.; et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* 2014, 123, e123–e133. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-554634>.
56. Torres, D.G.; Paes, J.; da Costa, A.G.; Malheiro, A.; Silva, G.V.; de Souza Mourão, L.P.; Tarragô, A.M. JAK2 variant signaling: genetic, hematologic and immune implication in chronic myeloproliferative neoplasms. *Biomolecules* 2022, 12, 291. <https://doi.org/10.3390/biom12020291>.
57. González García, C.; Funes Vera, C.; Blanquer Blanquer, M.; Moraleda Jiménez, J.M. Síndromes mieloproliferativos. *Med.-Programa de Form. Médica Contin. Acreditado* 2012, 11, 1289–1297. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(12\)70452-3](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(12)70452-3).
58. Di Battista, V.; Bochicchio, M.T.; Giordano, G.; Napolitano, M.; Lucchesi, A. Review genetics and pathogenetic role of inflammasomes in philadelphia negative chronic myeloproliferative neoplasms: A narrative review. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 561. <https://doi.org/10.3390/ijms22020561>.
59. Nangalia, J.; Massie, C.E.; Baxter, E.J.; Nice, F.L.; Gundem, G.; Wedge, D.C.; Avezov, E.; Li, J.; Kollmann, K.; Kent, D.G.; et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* 2014, 369, 2391–2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312542>.
60. Park, C.H.; Lee, K.O.; Jang, J.H.; Jung, C.W.; Kim, J.W.; Kim, S.H.; Kim, H.J. High frequency of JAK2 exon 12 mutations in Korean patients with polycythaemia vera: Novel mutations and clinical significance. *J. Clin. Pathol.* 2016, 69, 737–741. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2016-203649>.
61. Pietra, D.; Li, S.; Brisci, A.; Passamonti, F.; Rumi, E.; Theocharides, A.; Ferrari, M.; Gisslinger, H.; Kralovics, R.; Cremonesi, L.; et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008, 111, 1686–1689. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-101576>.
62. Scott, L.M.; Tong, W.; Levine, R.L.; Scott, M.A.; Beer, P.A.; Stratton, M.R.; Futreal, P.A.; Erber, W.N.; McMullin, M.F.; Harrison, C.N.; et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007, 356, 459–468. <https://doi.org/10.1056/nejmoa065202>.
63. Martínez-Avilés, L.; Besses, C.; Álvarez-Larrán, A.; Cervantes, F.; Hernández-Boluda, J.C.; Bellosillo, B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2007, 92, 1717–1718. <https://doi.org/10.3324/haematol.12011>.
64. Todorova, R.; Passweg, J.; Lundberg, P.; Tzankov, A. Does the order of mutational acquisition in myeloproliferative neoplasms matter? Evidence from JAK2 exon 12 and DNMT3A co-mutant polycythemia vera. *J. Hematop.* 2020, 13, 105–107. <https://doi.org/10.1007/s12308-020-00392-x>.
65. Easwar, A.; Siddon, A.J. Genetic landscape of myeloproliferative neoplasms with an emphasis on molecular diagnostic laboratory testing. *Life* 2021, 11, 1158. <https://doi.org/10.3390/life11111158>.
66. Tapper, W.; Jones, A.V.; Kralovics, R.; Harutyunyan, A.S.; Zoi, K.; Leung, W.; Godfrey, A.L.; Guglielmelli, P.; Callaway, A.; Ward, D.; et al. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Commun.* 2015, 6, 6691. <https://doi.org/10.1038/ncomms7691>.

67. Wang, L.; Swierczek, S.I.; Hickman, K.; Walker, K.; Wang, K.; Drummond, J.; Doddapaneni, H.; Reid, J.G.; Muzny, D.M.; Gibbs, R.A.; et al. The relationship of *JAK2V617F* and acquired UPD at chromosome 9p. *Leukemia* 2014, 28, 938–941. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.20>.
68. Pagliarini-e-Silva, S.; Santos, B.C.; Pereira, E.M.d.F.; Ferreira, M.E.; Baraldi, E.C.; Sell, A.M.; Visentainer, J.E.L. Evaluation of the association between the JAK2 46/1 haplotype and chronic myeloproliferative neoplasms in a Brazilian population. *Clinics* 2013, 68, 5–9. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(01\)OA02](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(01)OA02).
69. Tefferi, A.; Lasho, T.L.; Patnaik, M.M.; Finke, C.M.; Hussein, K.; Hogan, W.J.; Elliott, M.A.; Litzow, M.R.; Hanson, C.A.; Pardanani, A. JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: Nullizygotosity for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia* 2010, 24, 105–109. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.225>.
70. Landgren, O.; Goldin, L.R.; Kristinsson, S.Y.; Helgadottir, 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. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143602>.
71. Vannucchi, A.M.; Guglielmelli, P. The JAK2 46/1 (GGCC) NMP-predisposing haplotype: A risky haplotype, after all. *Am. J. Hematol.* 2019, 94, 283–285. <https://doi.org/10.1002/ajh.25367>.
72. 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, 1013. <https://doi.org/10.3390/ijms23031013>.
73. Yang, W.Y.; Hormozdiari, F.; Wang, Z.; He, D.; Pasaniuc, B.; Eskin, E. Leveraging reads that span multiple single nucleotide polymorphisms for haplotype inference from sequencing data. *Bioinformatics* 2013, 29, 2245–2252. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt386>.
74. Vannucchi, A.M. How many faces in MPDs? Bad news for GVHD prevention. *Blood* 2008, 111, 2785. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-127159>.
75. Goldstein, D.B.; Cavalleri, G.L. NEWS & VIEWS Understanding human diversity. *Nature* 2005, 437, 5–6.
76. Macedo, L.C.; Santos, B.C.; Pagliarini-e-Silva, S.; Pagnano, K.B.B.; Rodrigues, C.; Quintero, F.C.; Ferreira, M.E.; Baraldi, E.C.; Ambrosio-Albuquerque, E.P.; Sell, A.M.; et al. JAK2 46/1 haplotype is associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms in Brazilian patients. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015, 37, 654–660. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12380>.
77. Belmont, J.W.; Boudreau, A.; Leal, S.M.; Hardenbol, P.; Pasternak, S.; Wheeler, D.A.; Willis, T.D.; Yu, F.; Yang, H.; Gao, Y.; et al. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005, 437, 1299–1320. <https://doi.org/10.1038/nature04226>.
78. Slatkin, M. Linkage disequilibrium—Understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat. Rev. Genet.* 2008, 9, 477–485. <https://doi.org/10.1038/nrg2361>.
79. Calabrese, B. Linkage disequilibrium. *Encycl. Bioinform. Comput. Biol. ABC Bioinform.* 2018, 1–3, 763–765. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20234-3>.
80. Neale, B.M. Introduction to linkage disequilibrium, the HapMap, and imputation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, 5, 10–13. <https://doi.org/10.1101/pdb.top74>.
81. Tanaka, T. International HapMap project. *Nippon Rinsho. Jpn. J. Clin. Med.* 2005, 63 (Suppl. 1), 29–34. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7\\_100710](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_100710).
82. International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2005, 449, 851–861.
83. Auton, A.; Abecasis, G.R.; Altshuler, D.M.; Durbin, R.M.; Bentley, D.R.; Chakravarti, A.; Clark, A.G.; Donnelly, P.; Eichler, E.E.; Flicek, P.; et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015, 526, 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
84. Abecasis, G.R.; Auton, A.; Brooks, L.D.; DePristo, M.A.; Durbin, R.M.; Handsaker, R.E.; Kang, H.M.; Marth, G.T.; McVean, G.A. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012, 491, 56. <https://doi.org/10.1038/nature11632>.
85. Glusman, G.; Cox, H.C.; Roach, J.C. Whole-genome haplotyping approaches and genomic medicine. *Genome Med.* 2014, 6, 73. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0073-7>.
86. Martínez-Trillos, A.; Maffioli, M.; Colomer, D.; Alvarez-Larrán, A.; Pereira, A.; Angona, A.; Bellosillo, B.; Cervantes, F. Relationship between the 46/1 haplotype of the JAK2 gene and the JAK2 mutational status and allele burden, the initial findings, and the survival of patients with myelofibrosis. *Ann. Hematol.* 2014, 93, 797–802. <https://doi.org/10.1007/s00277-013-1989-5>.

87. Pardanani, A.; Fridley, B.L.; Lasho, T.L.; Gilliland, D.G.; Tefferi, A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008, 111, 2785–2789. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-095703>.
88. Masselli, E.; Pozzi, G.; Carubbi, C.; Vitale, M. The genetic makeup of myeloproliferative neoplasms: Role of germline variants in defining disease risk, phenotypic diversity and outcome. *Cells* 2021, 10, 2597. <https://doi.org/10.3390/cells10102597>.
89. Ohyashiki, J.H.; Yoneta, M.; Hisatomi, H.; Iwabuchi, T.; Umezumi, T.; Ohyashiki, K. The C allele of JAK2 rs4495487 is an additional candidate locus that contributes to myeloproliferative neoplasm predisposition in the Japanese population. *BMC Med. Genet.* 2012, 13, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-6>.
90. Chiang, Y.; Chang, Y.; Lin, H.; Huang, L. Germline variations at JAK2, TERT, HBS1L-MYB and MECOM and the risk of myeloproliferative neoplasms in Taiwanese population. *Oncotarget* 2017, 8, 76204–76213.
91. Smalberg, J.H.; Koehler, E.; Murad, S.D.; Plessier, A.; Seijo, S.; Trebicka, J.; Primignani, M.; De Maat, M.P.M.; Garcia-Pagan, J.C.; Valla, D.C.; et al. The JAK2 46/1 haplotype in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis. *Blood* 2011, 117, 3968–3973. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-319087>.
92. Bak, M.; Jess, T.; Flachs, E.M.; Zwisler, A.D.; Juel, K.; Frederiksen, H. Risk of inflammatory bowel disease in patients with chronic myeloproliferative neoplasms: A danish nationwide cohort study. *Cancers (Basel)*. 2020, 12, 2700. <https://doi.org/10.3390/cancers12092700>.
93. Zhang, J.X.; Song, J.; Wang, J.; Dong, W.G. JAK2 rs10758669 polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: A meta-analysis. *Inflammation* 2014, 37, 793–800. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9798-5>.
94. Ferguson, L.R.; Han, D.Y.; Fraser, A.G.; Huebner, C.; Lam, W.J.; Morgan, A.R.; Duan, H.; Karunasinghe, N. Genetic factors in chronic inflammation: Single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2010, 690, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.01.017>.
95. Barrett, J.C.; Hansoul, S.; Nicolae, D.L.; Cho, J.H.; Duerr, R.H.; Rioux, J.D.; Brant, S.R.; Silverberg, M.S.; Taylor, K.D.; Barmada, M.M.; et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 2008, 40, 955–962. <https://doi.org/10.1038/ng.175>.
96. Andrikovics, H.; Nahajevszky, S.; Koszarska, M.; Meggyesi, N.; Bors, A.; Halm, G.; Lueff, S.; Lovas, N.; Matrai, Z.; Csomor, J.; et al. JAK2 46/1 haplotype analysis in myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010, 24, 1809–1813. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.172>.
97. 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. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.055392>.
98. Kilpivaara, O.; Mukherjee, S.; Schram, A.M.; Wadleigh, M.; Mullally, A.; Ebert, B.L.; Bass, A.; Marubayashi, S.; Heguy, A.; Garcia-Manero, G.; et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of *JAK2V617F* -positive myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009, 41, 455–459. <https://doi.org/10.1038/ng.342>.
99. Li, S.L.; Zhang, P.J.; Sun, G.X.; Lu, Z.J. The JAK2 46/1 haplotype (GGCC) in myeloproliferative neoplasms and splanchnic vein thrombosis: A pooled analysis of 26 observational studies. *Ann. Hematol.* 2014, 93, 1845–1852. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2134-9>.
100. 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.; et al. Genetic association between germline JAK2 polymorphisms and myeloproliferative neoplasms in Hong Kong Chinese population: A case-control study. *BMC Genet.* 2014, 15, 147. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0147-y>.
101. Olcaydu, D.; Harutyunyan, A.; Jäger, R.; Berg, T.; Gisslinger, B.; Pabinger, I.; Gisslinger, H.; Kralovics, R. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009, 41, 450–454. <https://doi.org/10.1038/ng.341>.
102. 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, 19, 1152. <https://doi.org/10.3390/ijms19041152>.
103. Schram, A.M.; Xu, X.; Kilpivaara, O.; Mukherjee, S.; Viny, A.D.; Guryanova, O.; Klein, R.J.; Levine, R.L. Genetic and functional investigation of germline JAK2 alleles that predispose to myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011, 118, 124–124. <https://doi.org/10.1182/blood.v118.21.124.124>.
104. IGSR|Populations. Available online: <https://www.internationalgenome.org/data-portal/population> (accessed on 9 February 2022).

105. *Rs10974944* (SNP)-Population Genetics-Homo\_sapiens-Ensembl Genome Browser 105. Available online: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5070331-5071331;v=rs10974944;vdb=variation;vf=731581676](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5070331-5071331;v=rs10974944;vdb=variation;vf=731581676) (accessed on 9 February 2022).
106. *Rs3780367* (SNP)-Genética de Populações-Homo\_sapiens-Ensembl Genoma Browser 105. Available online: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5068255-5069255;v=rs3780367;vdb=variation;vf=729888189](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5068255-5069255;v=rs3780367;vdb=variation;vf=729888189) (accessed on 9 February 2022).
107. *Rs17302090* (SNP)-Population Genetics-Homo\_sapiens-Ensembl Genome Browser 105. Available online: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5073689-5074689;v=rs12343867;vdb=variation;vf=732179982](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5073689-5074689;v=rs12343867;vdb=variation;vf=732179982) (accessed on 9 February 2022).
108. *Rs1159782* (SNP)-Population Genetics-Homo\_sapiens-Ensembl Genome Browser 105. Available online: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5077617-5078617;v=rs1159782;vdb=variation;vf=729146257#population\\_freq\\_SAS](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5077617-5078617;v=rs1159782;vdb=variation;vf=729146257#population_freq_SAS) (accessed on 9 February 2022).
109. Tashi, T.; Swierczek, S.; Prchal, J.T. Familial NMP predisposition. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2017, 12, 442–447. <https://doi.org/10.1007/s11899-017-0414-x>.
110. Tefferi, A.; Lasho, T.L.; Mudireddy, M.; Finke, C.M.; Hanson, C.A.; Ketterling, R.P.; Gangat, N.; Pardanani, A. The germline *JAK2* GGCC (46/1) haplotype and survival among 414 molecularly-annotated patients with primary myelofibrosis. *Am. J. Hematol.* 2019, 94, 299–305. <https://doi.org/10.1002/ajh.25349>.
111. Lanikova, L.; Babosova, O.; Prchal, J.T. Experimental modeling of myeloproliferative neoplasms. *Genes* 2019, 10, 813. <https://doi.org/10.3390/genes10100813>.
112. Trifa, A.P.; Bănescu, C.; Bojan, A.S.; Voina, C.M.; Popa, Ștefana; Vișan, S.; Ciubean, A.D.; Tripon, F.; Dima, D.; Popov, V.M.; et al. MECOM, HBS1L-MYB, THRB-RARB, *JAK2*, and TERT polymorphisms defining the genetic predisposition to myeloproliferative neoplasms: A study on 939 patients. *Am. J. Hematol.* 2017, 93, 100–106. <https://doi.org/10.1002/ajh.24946>.
113. Zhang, X.; Hu, T.; Wu, Z.; Kang, Z.; Liu, W.; Guan, M. The *JAK2* 46/1 haplotype is a risk factor for myeloproliferative neoplasms in Chinese patients. *Int. J. Hematol.* 2012, 96, 611–616. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1169-8>.
114. Campbell, P.J. Somatic and germline genetics at the *JAK2* locus. *Nat. Methods* 2009, 41, 385–386. <https://doi.org/10.1038/ng0409-385>.
115. Olcaydu, D.; Rumi, E.; Harutyunyan, A.; Passamonti, F.; Pietra, D.; Pascutto, C.; Berg, T.; Jäger, R.; Hammond, E.; Cazzola, M.; et al. The role of the *JAK2* GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2011, 96, 367–374. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.034488>.
116. Miller, L.H.; Qu, C.K.; Pauly, M. Germline mutations in the bone marrow microenvironment and dysregulated hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 2018, 66, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.07.001>.
117. Nahajevszky, S.; Andrikovics, H.; Batai, A.; Adam, E.; Bors, A.; Csomor, J.; Gopcsa, L.; Koszarska, M.; Kozma, A.; Lovas, N.; et al. The prognostic impact of germline 46/1 haplotype of Janus Kinase 2 in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2011, 96, 1613–1618. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.043885>.
118. Qi, X.; Shao, M.; Peng, H.; Bi, Z.; Su, Z.; Li, H. In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into neurons and glial cells and differential protein expression in a two-compartment bone marrow stromal cell/neuron co-culture system. *J. Clin. Neurosci.* 2010, 17, 908–913. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.10.013>.
119. Lussana, F.; Rambaldi, A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J. Autoimmun.* 2017, 85, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.06.010>.
120. Nasillo, V.; Riva, G.; Paolini, A.; Forghieri, F.; Roncati, L.; Lusenti, B.; Maccaferri, M.; Messerotti, A.; Pioli, V.; Gilioli, A.; et al. Inflammatory microenvironment and specific t cells in myeloproliferative neoplasms: Immunopathogenesis and novel immunotherapies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 1906. <https://doi.org/10.3390/ijms22041906>.
121. Manshour, T.; Estrov, Z.; Quintás-Cardama, A.; Burger, J.; Zhang, Y.; Livun, A.; Knez, L.; Harris, D.; Creighton, C.J.; Kantarjian, H.M.; et al. Bone marrow stroma-secreted cytokines protect *JAK2V617F*-mutated cells from the effects of a *JAK2* inhibitor. *Cancer Res.* 2011, 71, 3831–3840. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4002>.
122. Grabek, J.; Straube, J.; Bywater, M.; Lane, S.W. NMP: The molecular drivers of disease initiation, progression and transformation and their effect on treatment. *Cells* 2020, 9, 1901. <https://doi.org/10.3390/cells9081901>.
123. Wang, J.; Xu, Z.; Liu, L.; Gale, R.P.; Cross, N.C.P.; Jones, A.V.; Qin, T.; Ai, X.; Xu, J.; Zhang, T.; et al. *JAK2V617F* allele burden, *JAK2* 46/1 haplotype and clinical features of Chinese with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2013, 27, 1763–1767. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.21>.

124. Wang, H.; Sun, G.; Zhang, P.; Zhang, J.; Gui, E.; Zu, M.; Jia, E.; Xu, H.; Xu, L.; Zhang, J.; et al. JAK2 V617F mutation and 46/1 haplotype in Chinese Budd-Chiari syndrome patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, 29, 208–214. <https://doi.org/10.1111/jgh.12379>.
125. Oddsson, A.; Kristinsson, S.Y.; Helgason, H.; Gudbjartsson, D.F.; Masson, G.; Sigurdsson, A.; Jonasdottir, A.; Jonasdottir, A.; Steingrimsdottir, H.; Vidarsson, B.; et al. The germline sequence variant rs2736100-C in TERT associates with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014, 28, 1371–1374. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.48>.
126. Motazed, E.; Maliepaard, C.; Finkers, R.; Visser, R.; De Ridder, D. Family-based haplotype estimation and allele dosage correction for polyploids using short sequence reads. *Front. Genet.* 2019, 10, 335. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00335>.
127. Accurso, V.; Santoro, M.; Mancuso, S.; Vajana, G.; Tomasello, R.; Rotolo, C.; Camarda, G.; Mattana, M.; Siragusa, S. Familial essential thrombocythemia: 6 cases from a mono-institutional series. *Clin. Case Rep.* 2022, 10, e05525. <https://doi.org/10.1002/ccr3.5525>.
128. Skoda, R.C. Hereditary myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2010, 95, 6–8. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.015941>.
129. Abruzzese, E.; Poeta, G.D.; Barbato, R.; Fratoni, S.; Trawinska, M.M.; Zangrilli, D.; Coletta, A.M.; Patroi, I.M.; Francesconi, F.; Santeusano, G.; et al. Discordant distribution of JAK2 V617F mutation in siblings with familial. *Blood* 2015, 107, 4572–4574.
130. Milosevic, J.D.; Kralovics, R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int. J. Hematol.* 2013, 97, 183–197. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1235-2>.
131. Jäger, R.; Harutyunyan, A.S.; Rumi, E.; Pietra, D.; Berg, T.; Olcaydu, D.; Houlston, R.S.; Cazzola, M.; Kralovics, R. Common germline variation at the TERT locus contributes to familial clustering of myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol.* 2014, 89, 1107–1110. <https://doi.org/10.1002/ajh.23842>.
132. Jones, A.V.; Campbell, P.J.; Beer, P.A.; Schnittger, S.; Vannucchi, A.M.; Zoi, K.; Percy, M.J.; McMullin, M.F.; Scott, L.M.; Tapper, W.; et al. The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010, 115, 4517–4523. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-236448>.
133. Patnaik, M.M.; Lasho, T.L.; Finke, C.M.; Gangat, N.; Caramazza, D.; Siragusa, S.; Hanson, C.A.; Pardanani, A.; Tefferi, A. MPL mutation effect on JAK2 46/1 haplotype frequency in *JAK2V617F*-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010, 24, 859–860. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.1>.
134. Pietra, D.; Casetti, I.; Da Vià, M.C.; Elena, C.; Milanese, C.; Rumi, E. JAK2 GGCC haplotype in MPL mutated myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol.* 2012, 87, 746–747. <https://doi.org/10.1002/ajh.23229>.
135. Soler, G.; Bernal-Vicente, A.; Antón, A.I.; Torregrosa, J.M.; Caparrós-Pérez, E.; Sánchez-Serrano, I.; Martínez-Pérez, A.; Sánchez-Vega, B.; Vicente, V.; Ferrer-Marin, F. The JAK2 46/1 haplotype does not predispose to CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. *Ann. Hematol.* 2015, 94, 789–794. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2266-y>.
136. Gau, J.-P.; Chen, C.-C.; Liu, C.-J.; Yu, Y.-B.; Hsiao, L.-T.; Liu, J.-H.; Chen, P.-M.; Tzeng, C.-H. The 46/1 haplotype frequency is not increased in patients of essential thrombocythemia with CALR mutations. *Blood* 2014, 124, 5204–5204. <https://doi.org/10.1182/blood.v124.21.5204.5204>.
137. Perner, F.; Perner, C.; Ernst, T.; Heidel, F.H. Roles of JAK2 in aging, inflammation, hematopoiesis and malignant transformation. *Cells* 2019, 8, 854.
138. Balassa, K.; Krahling, T.; Remenyi, P.; Batai, A.; Bors, A.; Kiss, K.P.; Torbagyi, E.; Gopcsa, L.; Lengyel, L.; Barta, A.; et al. Recipient and donor JAK2 46/1 haplotypes are associated with acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma* 2017, 58, 391–398. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1198956>.
139. Crawford, D.C.; Nickerson, D.A. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu. Rev. Med.* 2005, 56, 303–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.082103.104540>.
140. Sud, A.; Chattopadhyay, S.; Thomsen, H.; Sundquist, K.; Sundquist, J.; Houlston, R.S.; Hemminki, K. Familial risks of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2018, 132, 973–976. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-858597>.
141. Fu, R.; Liu, D.; Cao, Z.; Zhu, S.; Li, H.; Su, H.; Zhang, L.; Xue, F.; Liu, X.; Zhang, X.; et al. Distinct molecular abnormalities underlie unique clinical features of essential thrombocythemia in children. *Leukemia* 2016, 30, 746–749. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.167>.
142. Gao, G.; Allison, D.B.; Hoeschele, I. Haplotyping methods for pedigrees. *Hum. Hered.* 2009, 67, 248–266. <https://doi.org/10.1159/000194978>.
143. Hood, L.; Tian, Q. Systems approaches to biology and disease enable translational systems medicine. *Genom. Proteom. Bioinform.* 2012, 10, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.08.004>.

144. Hasan, S.; Cassinat, B.; Droin, N.; Le Couedic, J.P.; Favale, F.; Monte-Mor, B.; Lacout, C.; Fontenay, M.; Dosquet, C.; Chomienne, C.; 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. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.303>.
145. Tan, J.; Chow, Y.P.; Zainul Abidin, N.; Chang, K.M.; Selvaratnam, V.; Tumian, N.R.; Poh, Y.M.; Veerakumarasivam, A.; Laffan, M.A.; Wong, C.L. Analysis of genetic variants in myeloproliferative neoplasms using a 22-gene next-generation sequencing panel. *BMC Med. Genom.* 2022, 15, 10. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01145-0>.
146. Lee, J.E.; Choi, J.H.; Lee, J.H.; Lee, M.G. Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: Haplotype-based testing and analysis. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2005, 573, 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.018>.
147. Kushekhar, K.; Paczesny, S. JAK polymorphisms: Jack of all cytokines, masters GVHD? *Leuk. Lymphoma* 2017, 58, 255–256. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1205746>.

**CAPÍTULO III:**

**Estudo do íntron 12 de *JAK2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas  
*BCR::ABL1*- na Amazônia Brasileira: influência no status de *JAK2V617F*, frequência  
alélica variante e manifestações hematológicas**

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

(ISSN 2045-2322)

Fator de Impacto: 4,99 Qualis CAPES A1

**Estudo do íntron 12 de *JAK2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas  
*BCR/ABL1* negativas na Amazônia Brasileira: influência no status de *JAK2V617F*,  
frequência alélica variante e manifestações hematológicas**

Jhemerson F. Paes<sup>1</sup>, Dania G Torres<sup>1</sup>, George A. V. Silva<sup>1,3,4</sup>, Andréa M. Tarragô<sup>1,2,4</sup>, Lucivana P. de Souza Mourão<sup>1,5\*</sup>

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

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

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

4 Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Manaus, AM, Brasil

5 Escola Superior em Ciências da Saúde (ESA/UEA), Manaus 69065-001, AM, Brasil.

\***Autor correspondente:** Lucivana P. de Souza Mourão Escola Superior em Ciências da Saúde (ESA/UEA), Av. Carvalho Leal, 1777 - Cachoeirinha, Manaus - AM, 69065-001. E-mail: lpsouza@uea.edu.br

## RESUMO

*JAK2V617F* é uma alteração genética comum em neoplasias mieloproliferativas *BCR/ABL1* negativas e está associado ao haplótipo 46/1 que está em desequilíbrio de ligação estreito com a variante *rs10974944* (C>G) localizada no íntron 12 do gene *JAK2*. Esse haplótipo também influencia as alterações laboratoriais, frequência alélica das variantes e correlações com neoplasias mieloproliferativas familiares. Este estudo teve como objetivo avaliar o haplótipo 46/1 (*rs10974944*:G) e outras variantes do íntron 12 (*rs10119004*, *rs1081515* e *rs59720809*) em uma população da Amazônia brasileira. Foram incluídos no estudo 108 indivíduos diagnosticados clinicamente com policitemia vera (n=39), trombocitemia essencial (n=61) e mielofibrose (n=8). Dados clínicos, laboratoriais e análises moleculares por reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de Sanger foram considerados. Observou-se que os indivíduos com policitemia vera e portadores do alelo G de *rs10974944* apresentaram valores significativamente aumentados de volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, no grupo de trombocitemia essencial, foram observados níveis elevados de glóbulos vermelhos, hematócrito e hemoglobina ( $p < 0,05$ ). Foi observada uma associação entre a frequência genotípica de *rs10974944* (G) e o status da variante *JAK2V617F*. Indivíduos com o alelo G e o genótipo GG de *rs10974944* apresentaram uma associação significativa com o status positivo para *JAK2V617F* ( $p < 0,05$ ), assim como um aumento na frequência alélica da variante. Além disso, *rs10815151* demonstrou uma associação com o status negativo para *JAK2V617F*. Com base nos nossos dados, podemos sugerir uma associação entre *rs10974944* (G) e o status positivo para *JAK2V617F*, bem como alterações laboratoriais e um aumento na frequência alélica da variante. Além disso, *rs10815151* pode ser considerado um possível marcador de resistência ou proteção para o status positivo de *JAK2V617F* na população estudada.

**Palavras chaves:** JAK2, neoplasias mieloproliferativas crônicas, haplótipo, polimorfismos de nucleotídeo único.



## INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) são doenças clonais de célula-tronco hematopoética caracterizadas por hiperplasia de um ou mais elementos da série mieloide com maturação eficaz, resultando em leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocitária e possível evolução para fibrose medular ou transformação leucêmica<sup>1</sup>. Com uma incidência de 6 casos a cada 100.000 habitantes, essas patologias atingem majoritariamente indivíduos entre 60 e 70 anos, sendo a maioria do sexo masculino e de raça branca<sup>2,3</sup>. Policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MF), são descritas as NMPs *BCR::ABL1* negativas mais frequentes, as quais diferenciam-se por sinais, sintomas, alterações laboratoriais e clínicas e os achados genéticos<sup>5,4</sup>.

A variante *JAK2V617F* (dbSNP ID: *rs77375493*) é o principal achado genético nas NMPs<sup>6</sup>. Trata-se de uma substituição de valina por fenilalanina no códon 617 da cadeia polipeptídica de JAK2, que altera seu domínio regulatório e condiciona uma atividade constitutiva da via JAK/STAT<sup>7</sup>. Essa alteração genética tornou-se um marcador de interesse, identificada em torno de 90% dos casos de policitemia vera e entre 50% a 60 % dos casos de trombocitemia essencial e mielofibrose primária<sup>3,8-10</sup>. Mesmo com protagonismo na etiopatogênese das NMPs, *JAK2V617F* não é uma variante germinativa, o que condicionou diversas hipóteses sobre os eventos que antecedem a aquisição dessa alteração genética.

Estudos demonstraram uma associação entre *JAK2V617F* e o haplótipo 46/1, um conjunto de variações genéticas da linha germinativa distribuídas ao longo do cromossomo 9p.24.1<sup>11</sup>. Esse haplótipo abrange regiões com alto índice de variantes genéticas em *JAK2* (éxon 12 e 14) e está em desequilíbrio de ligação completo com a variante *rs10974944* (C>G), localizada no íntron 12 do mesmo gene<sup>12,13</sup>. Pesquisadores indicam essa alteração genética como um fator que favorece a aquisição de *JAK2V617F*<sup>3,12,14,15</sup> por aumentar a taxa mutacional de *JAK2*, o que pode levar a danos no DNA e erros de replicação<sup>16</sup>. Além de ser identificado em pacientes NMPs de diversas populações, esse haplótipo também foi associado a alterações laboratoriais mais acentuadas, presença de esplenomegalia, desregulação inflamatória, casos familiares de NMPs (elevando o risco de desenvolver alguma neoplasia mieloproliferativa em 5 a 7 vezes) e metilação anormal do promotor gênico<sup>17,18</sup>.

A presente pesquisa estudou o haplótipo 46/1 do gene *JAK2*, analisando as variantes *rs10974944* (G), *JAK2V617F* e outras variantes identificadas na região genômica analisada em uma população da Amazônia brasileira. Além disso, foi avaliada uma possível associação da

variante com parâmetros laboratoriais, carga alélica variante (VAF) e foram identificados obtidos a partir dos SNVs pareados.

## **Materiais e métodos**

**População:** Foram incluídos 108 indivíduos com diagnóstico clínico para neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas. O estudo foi realizado de fevereiro de 2021 a janeiro de 2023. A análise laboratorial foi realizada no Laboratório de genômica. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hospitalar em Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. O consentimento informado por escrito foi obtido de paciente ou de um substituto apropriado se o paciente não conseguiu fornecer consentimento. Este estudo atendeu a resolução n 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos com parecer: nº 4.450.813 e certificado de apresentação de apreciação ética nº 39991420.6.0000.0009.

**Dados clínicos e laboratoriais:** Os dados clínicos (sexo, idade, esplenomegalia, eventos cardiovasculares, trombóticos e/ou hemorrágicos) foram obtidos por meio de prontuários médicos e os dados laboratoriais foram obtidos através dos resultados prévios obtidos através da pesquisa de Torres e colaboradores (dados não publicados).

**Amostra biológica e extração de DNA:** amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos contendo EDTA e o DNA foi extraído com Brazol (*Lgcbio, Brasil*), seguindo as orientações do fabricante, e armazenado a -80°C.

**PCR convencional e purificação da PCR:** para a amplificação da região do DNA em análise, utilizou-se uma reação com volume final de 25 µL com 50-100 ng de DNA genômico, Tampão (1x), MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), Primer FW (CCAACTGAGTTTCCTTGCAG) e RV (CTAGGTTAAGAGTATGTGGTTCC) (0.4 mM), dNTP mix (0.2 mM) e TAQ 1U Os primers foram desenhados especificamente para o presente estudo na plataforma Primer-BLAST- NCBI e OligoAnalyzer Tool-IDTDNA.com, avaliando a porcentagem de GC, Tm, capacidade de Hairpin, e índice ΔG. Os produtos das reações foram visualizados mediante eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. O produto da PCR, um amplicon com 572 pb, foi purificado com Polietilenglicol 8000 (*Promega*).

**Sequenciamento dos nucleotídeos e análise de seqüências:** Aproximadamente 5-30 ng de produto de PCR purificado foi aplicado na reação de sequenciamento. O sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado usando BigDye® *Terminator* v3.1 (*Applied Biosystems*), seguindo recomendações do fabricante e os primers descritos anteriormente. Os produtos foram

purificados pelo protocolo de EDTA/Etanol, e avaliados no sequenciador automático 3500 XL Genetic Analyzer® (Applied BioSystems, USA), com polímero POP-7. As sequências foram inicialmente analisadas no software *Sequencing Analysis* (Applied biosystem [Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil]). Software *Geneious* 6.0.6 (Biomatters, USA) usado para fazer o mapeamento das variantes e comparação com a sequência de referência *Homo sapiens Janus kinase 2* (JAK2), (NCBI: NG\_009904.1).

**Análise dos haplótipos:** As frequências dos haplótipos foram calculadas usando o Haploview software (v.4.2), como medida do Desequilíbrio de Ligação (DL). Haplótipos com frequências <1% não foram considerados relevantes para comparações. O grau de *pairwise* entre os nucleotídeos foi analisado pela estrutura LD, considerando valores de  $r^2 > 0,8$  como DL forte,  $< 0,8$  para fraco e  $< 0,1$  como DL negativo.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado comparando as frequências estimadas com as observadas dos genótipos pelo teste  $\chi^2$ . SNVs com valores de  $p < 0,001$  foram considerados como em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Análise estatística:** Os resultados obtidos passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%), e foram testadas pelo  $\chi^2$  e teste exato de Fisher com intervalo de confiança de 95%. As variáveis numéricas foram expressas por mediana (Md) e intervalo interquartil [IIQ] com percentil de 75% através do software GraphPad Prism v.9.0.2. Para as variáveis não paramétricas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Para ambas as análises foi realizado o pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações, também pelo software GraphPad Prism v.9.0.2. Valores de  $p < 0,05$  consideraram-se estatisticamente significativos.

## Resultados

### Caracterização clínico-laboratorial

Foram incluídos 108 indivíduos no estudo com características clínicas e laboratoriais descritas na tabela 1. A maioria de indivíduos do sexo feminino tiveram o diagnóstico de TE (n=48) ( $p = 0,002$ ). A idade mediana dos participantes foi semelhante entre os grupos.

As medianas de RBC, Ht e Hb foram significativamente maiores no grupo PV em comparação com TE (RBC:  $5,57 \text{ mm}^3$ ; Ht: 48%; Hb:  $15,4 \text{ g/dL}$ ,  $p < 0,0001$ ) (tabela1), já outros marcadores hematológicos demonstraram-se significativamente aumentados na TE em comparação a PV como o VCM ( $103,9 \text{ pg}$ ,  $p < 0,0001$ ), HCM ( $33,5 \text{ fL}$ ,  $p < 0,0001$ ) e plaquetas ( $467000 \times \text{mm}^3$ ,  $p < 0,0001$ ).

**Tabela 1:** Características clínicas e laboratoriais de pacientes com neoplasias mieloproliferativas

| CARACTERÍSTICAS                         | PV (n=39)                 | TE (n=61)                 | MF (n=8)                  | valor de p        |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| Homens/Mulheres, n                      | 20/19                     | 13/48                     | 5/3                       | <b>0,002</b>      |
| Idade, Md [IIQ]                         | 61 [49-71]                | 58 [43,5-72]              | 61 [54-72,7]              | 0,599             |
| RBC (x mm <sup>3</sup> ), Md [IIQ]      | 5,57 [4,3-6,1]            | 3,75 [3,2-4,5]            | 3,25 [2,8-4,7]            | <b>&lt;0,0001</b> |
| Ht (%), Md [IIQ]                        | 48,0 [44,1-52,3]          | 37,9 [35,7-42,3]          | 30,3 [23,3-38,7]          | <b>&lt;0,0001</b> |
| Hb (g/dL), Md [IIQ]                     | 15,4 [13,8-16,3]          | 12,6 [11,6-13,9]          | 9,5 [7,4-12]              | <b>&lt;0,0001</b> |
| VCM (pg), Md [IIQ]                      | 90,3 [82,6-103,5]         | 103,9 [74,9-112,7]        | 86,3 [78,6-92,9]          | <b>&lt;0,0001</b> |
| HCM (fL), Md [IIQ]                      | 29,5 [26,7-33,1]          | 33,5 [30,3-36,7]          | 28,5 [24,6-29]            | <b>&lt;0,0001</b> |
| CHCM (g/dL), Md [IIQ]                   | 32 [30,6-33,5]            | 32,5 [32-33,6]            | 31,3 [30,4-33,4]          | 0,237             |
| WBC (x mm <sup>3</sup> ), Md [IIQ]      | 6540 [5150-7990]          | 5730 [3940-7110]          | 9115 [3235-13368]         | <b>0,028</b>      |
| Plaquetas (/mm <sup>3</sup> ), Md [IIQ] | 294000<br>[174000-391000] | 467000<br>[361500-547500] | 305500<br>[134250-408500] | <b>&lt;0,0001</b> |
| DHL (U/L), Md [IIQ]                     | 438,6<br>[318,4-533,6]    | 420<br>[354,5-495,5]      | 904,5<br>[488,2-1276]     | <b>0,026</b>      |
| Ácido úrico (mg/dL), Md [IIQ]           | 4,5 [3,5-5,9]             | 4,1 [2,8-4,8]             | 6,8 [4,3-8]               | <b>0,003</b>      |
| PT (seg), Md [IIQ]                      | 11,6 [10,9-12,6]          | 11,4 [10,8-12,2]          | 13,85 [13,1-14,2]         | <b>0,0008</b>     |
| INR, Md [IIQ]                           | 0,9 [0,9-1]               | 0,9 [0,9-1]               | 1,1 [1,1-1,2]             | <b>0,0007</b>     |
| aPTT (seg), Md [IIQ]                    | 31,1 [27,8-36]            | 30,3 [28-33,1]            | 36,1 [32,1-40,7]          | <b>0,019</b>      |
| Fibrinogênio (mg/dL), Md [IIQ]          | 278 [223-320]             | 296 [249,5-378]           | 302 [210,5-443,5]         | 0,139             |
| Esplenomegalia, n (%)                   | 9 (23)                    | 10 (16,3)                 | 5 (62,5)                  | <b>0,001</b>      |
| Eventos trombóticos, n (%)              | 8 (20,5)                  | 15 (24,5)                 | 0                         | 0,270             |
| Eventos hemorrágicos, n (%)             | 1 (2,5)                   | 14 (22,9)                 | 0                         | <b>0,004</b>      |
| <i>JAK2V617F</i> <sup>+</sup> n (%)     | 23 (58,9)                 | 22 (36)                   | -                         | <b>0,020</b>      |
| VAF <i>JAK2V617F</i> ≥ 50%              | 16 (41)                   | 4 (6,5)                   | -                         | <b>0,005</b>      |
| VAF <i>JAK2V617F</i> < 50%              | 7 (17,9)                  | 18 (29,5)                 | -                         |                   |
| <i>JAK2V617F</i> não relatado n (%)     | 3 (7,6)                   | 4 (6,4)                   | -                         | >0,999            |

**Legenda:** PV: policitemia vera, TE: trombocitemia essencial, MF: mielofibrose, RBC: contagem de eritrócitos, Ht: hematócrito, Hb: hemoglobina, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, WBC: contagem de leucócitos, DHL: lactato desidrogenase, PT: tempo de protrombina, INR: razão internacional normalizada, aPTT: tempo de tromboplastina parcial ativada, VAF: frequência alélica variante, IIQ: intervalo interquartil, Md: mediana. Valores de referência: RBC: 3.9-5.3 mm<sup>3</sup>, Ht: 36-48%, Hb: 12-16 g/dL, VCM: 80-100 fL, HCM: 27-33 pg, CHCM: 32-36 g/dL, WBC: 3600-11000 mm<sup>3</sup>, PQT: 150000-400000 mm<sup>3</sup>, AU: 3,5- 7,2 mg/dL (homem); 2,6 - 6,0 mg/dL (mulher), Fibrinogênio: 180-350 mg/dL

MF apresentou valores significativamente aumentados de DHL (904,5 U/L,  $p = 0,026$ ), Ácido úrico (6,8 mg/dL,  $p = 0,003$ ), PT (13,85 seg,  $p = 0,0008$ ), INR (1,1,  $p = 0,0007$ ), aPTT (36,1 seg,  $p = 0,019$ ). Eventos hemorrágicos foram significativamente mais comuns no grupo TE quando comparado a PV ( $p = 0,004$ ), enquanto a frequência de esplenomegalia e eventos trombóticos não diferiram significativamente entre PV e TE ( $p > 0,05$ ).

*JAK2V617F*<sup>+</sup> foi significativamente superior na PV (58,9%,  $p = 0,020$ ). Os dados de VAF de *JAK2V617F* confirmam esses achados indicando que 41% dos pacientes com PV apresentaram uma alta frequência alélica (VAF  $\geq 50\%$ ), quando comparado a TE, que apresentou apenas 6,6% de VAF  $\geq 50\%$  ( $p = 0,005$ ).

### Variantes genéticas identificadas

A região analisada, com extensão de 572 pb, permitiu identificação de outras alterações genéticas ao longo do íntron 12. Além de *rs10974944* (C>G), foram identificadas *rs10119004* (A>G), *rs1081515* (G>T) e *rs59720809* (A>G). Os dados sobre frequência alélica e genotípica estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2:** Frequência genotípica e alélica de SNVs identificados em indivíduos com neoplasias mieloproliferativas incluídos no estudo

| Genótipo/alelo; n (%)              | PV (n = 39) | TE (n = 61) | MF (n = 8) |
|------------------------------------|-------------|-------------|------------|
| <b><i>rs10974944</i> (C&gt;G)*</b> |             |             |            |
| CC                                 | 12 (30,7)   | 25 (41)     | 2 (25)     |
| CG                                 | 13 (33,3)   | 24 (39,3)   | 2 (25)     |
| GG                                 | 14 (36)     | 12 (19,7)   | 4 (50)     |
| C                                  | 37 (47,4)   | 74 (60,7)   | 6 (37,5)   |
| G                                  | 41 (53,6)   | 48 (39,3)   | 10 (62,5)  |
| <b><i>rs10815151</i> (C&gt;T)</b>  |             |             |            |
| CC                                 | 25 (64,1)   | 33 (54,1)   | 7 (87,5)   |
| CT                                 | 9 (23,1)    | 23 (37,7)   | 1 (12,5)   |
| TT                                 | 5 (12,8)    | 5 (8,2)     | -          |
| C                                  | 59 (75,6)   | 89 (72,9)   | 15 (93,7)  |
| T                                  | 19 (24,4)   | 33 (27,1)   | 1 (6,3)    |
| <b><i>rs59720809</i> (A&gt;G)</b>  |             |             |            |
| AA                                 | 37 (94,9)   | 55 (90,2)   | 8 (100)    |
| AG                                 | 2 (5,1)     | 6 (9,8)     | -          |
| GG                                 | -           | -           | -          |
| A                                  | 76 (97,4)   | 116 (95,1)  | 16 (100)   |
| G                                  | 2 (2,6)     | 6 (4,9)     | -          |
| <b><i>rs10119004</i> (A&gt;G)</b>  |             |             |            |
| AA                                 | 25 (64,1)   | 26 (42,6)   | 5 (62,5)   |
| AG                                 | 9 (23,1)    | 29 (47,5)   | 2 (25)     |

|    |           |           |          |
|----|-----------|-----------|----------|
| GG | 5 (12,8)  | 6 (9,9)   | 1 (12,5) |
| A  | 59 (75,6) | 81 (66,4) | 12 (75)  |
| G  | 19 (24,4) | 41 (33,6) | 4 (25)   |

**Legenda:** PV: policitemia vera, TE: trombocitemia essencial, MF: mielofibrose, NMPs: neoplasias mieloproliferativas. \*Em desequilíbrio de ligação estreito com o haplótipo 46/1. Nenhum SNV apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,001$ ).

Do total de indivíduos incluídos no estudo, 63,9% apresentaram a variante *rs10974944* (G), 27,8% em homozigose (GG) e 36,1% em heterozigose (CG). O genótipo GG foi mais frequente no grupo PV (36%). Quanto ao genótipo CG, ele é mais frequente em ambos os grupos, com valores próximos (33,3% em PV e 39,3% em TE). Já em relação à frequência alélica, alelo G foi mais frequente em PV (53,6%) e o alelo C é mais frequente em TE (60,7%). A frequência do genótipo GG em mielofibrose foi elevada (50%), todavia, a quantidade de indivíduos incluídos no estudo representa uma amostra discreta.

O alelo T de *rs10815151* foi mais prevalente em PV e TE (24,4% e 27,1%, respectivamente). *rs59720809* (C>G) apresentou em baixas frequências em todos os grupos populacionais (PV: 5.1%; TE: 9.8%; MF: 0). O alelo G de *rs10119004* foi menor nos grupos PV em comparação com o grupo TE (24,4% vs. 33,63%, respectivamente). nenhuma

As tabelas 3 e 4 apresentam valores de características sanguíneas de indivíduos com policitemia vera e trombocitemia essencial, respectivamente, e diferentes genótipos para o *rs10974944* (CC, CG e GG). Para PV, indivíduos com o alelo G apresentaram valores significativamente aumentados de VCM e HCM ( $p = 0,030$  e  $p = 0,041$ , respectivamente). Assim como, indivíduos com TE, o alelo G de *rs10974944* foi associado a índices elevados de RBC, Ht e HB apresentaram valores de  $p$  significativos ( $p < 0,05$ )

**Tabela 3:** Características laboratoriais de indivíduos com policitemia vera e o alelo G de *rs10974944*

| Características                                     | C/C (n=12)             | Alelo G (n=27)         | Valor de $p$ |
|---|------------------------|------------------------|--------------|
| RBC (x mm <sup>3</sup> ), M <sub>d</sub> [IIQ]      | 5,9 [4,7-6,6]          | 4,8 [4,2-6]            | 0,188        |
| Ht (%), M <sub>d</sub> [IIQ]                        | 49,8 [43-52,2]         | 48 [44,1-53,1]         | 0,866        |
| Hb (g/dL) M <sub>d</sub> [IIQ]                      | 15,7 [13,1-16,2]       | 15,4 [13,9-16,6]       | 0,958        |
| VCM (pg) M <sub>d</sub> [IIQ]                       | 83,6 [81,7-89,5]       | 93,7 [86,6-104,9]      | <b>0,030</b> |
| HCM (fL), M <sub>d</sub> [IIQ]                      | 27,3 [24,1-29,4]       | 30,9 [28,1-33,3]       | <b>0,041</b> |
| CHCM (g/dL)   | 32,1 [30,4-36,1]       | 32 [30,6-33,5]         | 0,816        |
| WBC (x mm <sup>3</sup> ) M <sub>d</sub> [IIQ]       | 6670 [3835-11118]      | 6540 [5190-12580]      | 0,911        |
| Plaquetas (x mm <sup>3</sup> ) M <sub>d</sub> [IIQ] | 258000 [176250-440000] | 302000 [174000-391000] | 0,0747       |

**Legenda:** RBC: contagem de eritrócitos, Ht: hematócrito, Hb: hemoglobina, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, WBC:

contagem de leucócitos. Valores de referência: RBC: 3.9-5.3 mm<sup>3</sup>, Ht: 36-48%, Hb: 12-16 g/dL, VCM: 80-100 fL, HCM: 27-33 pg, CHCM: 32-36 g/dL, WBC: 3600-11000 mm<sup>3</sup>, PQT: 150000-400000 mm<sup>3</sup>.

**Tabela 4:** Características laboratoriais de indivíduos com trombocitemia essencial e alelo G de *rs10974944*

| Características                         | C/C (n=25)             | Alelo G (n=36)          | Valor de p   |
|---|------------------------|-------------------------|--------------|
| RBC (x mm <sup>3</sup> ), Md [IIQ]      | 3,4 [3,1-3,9]          | 4,1 [3,3-4,7]           | <b>0,029</b> |
| Ht (%), Md [IIQ]                        | 36,9 [35-39,5]         | 40,4 [35,9-44,4]        | <b>0,025</b> |
| Hb (g/dL) Md [IIQ]                      | 12,1 [11,1-13,0]       | 13,5 [12-14,6]          | <b>0,004</b> |
| VCM (pg) Md [IIQ]                       | 106,5 [94,2-113,2]     | 101,5 [90,5-112,6]      | 0,330        |
| HCM (fL), Md [IIQ]                      | 33,6 [31,5-37,5]       | 32,7 [29,8-36,6]        | 0,383        |
| CHCM (g/dL)                             | 32,4 [31,6-33,4]       | 32,5 [32,1-34,2]        | 0,597        |
| WBC (x mm <sup>3</sup> ) Md [IIQ]       | 5260 [3810-7455]       | 5410 [4233-6670]        | 0,740        |
| Plaquetas (x mm <sup>3</sup> ) Md [IIQ] | 483000 [368500-704500] | 440500 [323750-1119000] | 0,127        |

**Legenda:** RBC: contagem de eritrócitos, Ht: hematócrito, Hb: hemoglobina, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, WBC: contagem de leucócitos. Valores de referência: RBC: 3.9-5.3 mm<sup>3</sup>, Ht: 36-48%, Hb: 12-16 g/dL, VCM: 80-100 fL, HCM: 27-33 pg, CHCM: 32-36 g/dL, WBC: 3600-11000 mm<sup>3</sup>, PQT: 150000-400000 mm<sup>3</sup>.

#### Distribuição das variantes em pacientes estratificados de acordo com o status de *JAK2V617F* e frequência alélica variante

Considerando a forte associação da variante com *JAK2V617F*, foi realizada a análise da frequência genotípica de *rs10974944* (C>G) de acordo com o status positivo (+) ou negativo (-) de *JAK2V617F*, cujo os dados estão descritos na tabela 5. Dos 93 indivíduos com dados sobre a variante, a relação de status positivo/negativo para *JAK2V617F* foi de 45/48, respectivamente.

O genótipo GG e G carriers de *rs10974944* foram os mais frequentes na população *JAK2V617F*<sup>+</sup> (42,2% e 61,1%, respectivamente). Indivíduos com genótipo CG/GG desta variante apresentam maior probabilidade de apresentar *JAK2V617F*<sup>+</sup> (OR: 8,4; IC 95% 2,6-24,8; p = 0,002), tal como os genótipos GG (OR: 4,1; IC 95% 1,62-9,7; p = 0,002) e o alelo G, que demonstrou um risco 3,4 vezes maior de indivíduos portadores apresentarem *JAK2V617F*<sup>+</sup> (OR: 3,47; IC 95% 1,9-6,2; p < 0,0001), sugerindo uma possível associação do *rs10974944* G com a variante *JAK2V617F*.

Em contrapartida, os genótipos CT, TT e alelo T de *rs10815151* apresentaram frequências menores em ambas as populações. Indivíduos *JAK2V617F*<sup>-</sup> foram fortemente associados aos genótipos CT e TT/CT de *rs10815151* (OR = 0,2; IC 95% = 0,1-0,6; p = 0,009; OR = 0,3; IC 95% = 0,1-0,8; p = 0,032, respectivamente), indicando-o como um possível marcador de resistência ou proteção para a variante.

**Tabela 5:** Distribuição de SNVs em indivíduos NMPs estratificados de acordo com o status de *JAK2V617F*

| Genótipo/alelo; n (%)              | <i>JAK2V617F</i> <sup>+</sup><br>(n = 45) | <i>JAK2V617F</i> <sup>-</sup><br>(n = 48) | OR<br>(IC 95%)        | Valor de p        |                    |
|------------------------------------|---|---|-----------------------|-------------------|--------------------|
| <b><i>rs10974944</i> (C&gt;G)*</b> |   |   |                       |                   |                    |
| CC                                 | 9 (20)                                    | 24 (50)                                   | 2,6 (0,97-7,2)        | 0,530             | CC vs CG           |
| CG                                 | 18 (37,8)                                 | 18 (37,5)                                 | <b>8,4 (2,6-24,8)</b> | <b>0,002</b>      | <b>CC vs CG/GG</b> |
| GG                                 | 19 (42,2)                                 | 6 (12,5)                                  | <b>4,1 (1,8-13,9)</b> | <b>0,002</b>      | <b>CC vs GG</b>    |
| C                                  | 35 (38,9)                                 | 66 (68,7)                                 | <b>3,4 (1,9-6,2)</b>  | <b>&lt;0,0001</b> |                    |
| G                                  | 55 (61,1)                                 | 30 (31,2)                                 |                       |                   |                    |
| <b><i>rs10119004</i> (A&gt;G)</b>  |   |   |                       |                   |                    |
| AA                                 | 27 (60,0)                                 | 20 (41,6)                                 | 0,5 (0,2-1,2)         | 0,187             | AA vs AG           |
| AG                                 | 15 (33,3)                                 | 21 (43,8)                                 | 0,7 (0,3-1,5)         | 0,470             | AA vs AG/GG        |
| GG                                 | 3 (6,7)                                   | 7 (14,6)                                  | 0,3 (0,08-1,4)        | 0,166             | AA vs GG           |
| A                                  | 69 (76,6)                                 | 61 (67,8)                                 | 1,2 (0,6-2,3)         | 0,615             |                    |
| G                                  | 21 (23,4)                                 | 38 (42,2)                                 |                       |                   |                    |
| <b><i>rs10815151</i> (C&gt;T)</b>  |   |   |                       |                   |                    |
| CC                                 | 33 (73,4)                                 | 24 (50)                                   | <b>0,2 (0,1-0,6)</b>  | <b>0,009</b>      | <b>CC vs CT</b>    |
| CT                                 | 7 (15,5)                                  | 20 (41,7)                                 | <b>0,3 (0,1-0,8)</b>  | <b>0,032</b>      | <b>CC vs TT/CT</b> |
| TT                                 | 5 (11,1)                                  | 4 (8,3)                                   | 0,9 (0,2-3,2)         | >0,999            | CC vs TT           |
| C                                  | 73 (81)                                   | 68 (70,8)                                 | 0,5 (0,2-1,1)         | 0,123             |                    |
| T                                  | 17 (19)                                   | 28 (29,2)                                 |                       |                   |                    |

**Legenda:** NMPs: neoplasias mieloproliferativas, *JAK2V617F*<sup>+</sup>: *JAK2V617F* positivo, *JAK2V617F*<sup>-</sup>: *JAK2V617F* negativo. \*Em desequilíbrio de ligação estreito com o haplótipo 46/1.

### Associação entre frequência alélica variante de *JAK2V617F*

A associação com a frequência alélica variante de *JAK2V617F* e os SNVs foi mensurada, com resultados descritos na tabela 6. Análises demonstraram um risco 13,1 vezes maior de indivíduos com o genótipo GG do polimorfismo *rs10974944* apresentar uma VAF acima de 50% quando comparado ao genótipo CC (OR de 13,1; IC 95%: 1,8-72,3; p = 0,004). Em relação ao alelo, portadores do alelo G apresentaram um risco 6 vezes maior de apresentar VAF  $\geq$ 50% quando comparado ao alelo selvagem (C) (OR: 6,0; IC 95%: 2,1-14,8; p = 0,0002).

O alelo T de *rs10815151* demonstrou associação com VAF <50% (OR: 5,5; IC 95%: 1,7-16,2; p = 0,002), ao passo que o genótipo AA e alelo A de *rs10119004* demonstrou associação com VAF  $\geq$ 50% (p < 0,05).



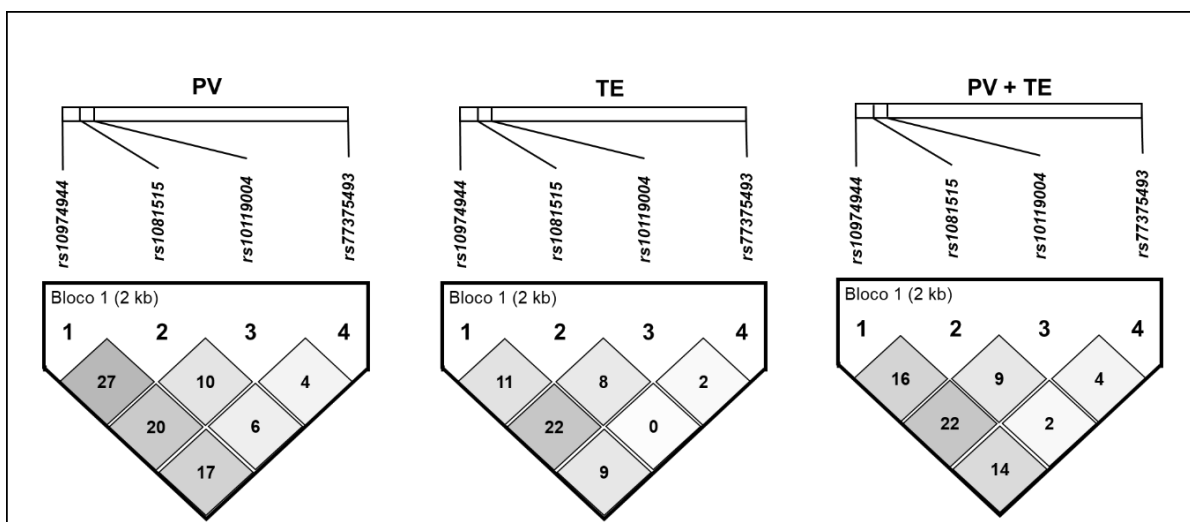
**Tabela 6:** Distribuição de SNVs em pacientes NMPs estratificados de acordo com a VAF de *JAK2V617F*

| Genótipo/alelo; n (%)              | VAF $\geq 50\%$<br>(n = 20) | VAF $< 50\%$<br>(n = 25) | OR (95% IC)            | Valor de p    |             |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------|---------------|-------------|
| <b><i>rs10974944</i> (C&gt;G)*</b> |                             |                          |                        |               |             |
| CC                                 | 2 (10)                      | 7 (28)                   | 0,7 (0,1-5)            | 0,778         | CC vs CG    |
| CG                                 | 3 (15)                      | 14 (56)                  | 3,5 (0,7-18)           | 0,133         | CC vs GG/CG |
| GG                                 | 15 (75)                     | 4 (16)                   | <b>13,1 (1,8-72,3)</b> | <b>0,004</b>  | CC vs GG    |
| C                                  | 7 (17,5)                    | 28 (56)                  | <b>6 (2,1-14,8)</b>    | <b>0,0002</b> | C vs G      |
| G                                  | 33 (82,5)                   | 22 (44)                  |                        |               |             |
| <b><i>rs10119004</i> (A&gt;G)</b>  |                             |                          |                        |               |             |
| AA                                 | 16 (80)                     | 11 (44)                  | <b>5,8 (1,3-21,9)</b>  | <b>0,023</b>  | AA vs AG    |
| AG                                 | 3 (15)                      | 12 (48)                  | <b>5 (1,3-16,5)</b>    | <b>0,017</b>  | AA vs CC/AG |
| GG                                 | 1 (5)                       | 2 (8)                    | 2,9 (0,2-44,4)         | 0,564         | AA vs GG    |
| A                                  | 35 (87,5)                   | 34 (68)                  | <b>3,2 (1-8,8)</b>     | <b>0,029</b>  | A vs G      |
| G                                  | 5 (12,5)                    | 16 (32)                  |                        |               |             |
| <b><i>rs10815151</i> (C&gt;T)</b>  |                             |                          |                        |               |             |
| CC                                 | 17 (85)                     | 16 (64)                  | 2,6 (0,4-14,5)         | 0,412         | CC vs CT    |
| CT                                 | 2 (10)                      | 5 (20)                   | 3,1 (0,7-12,1)         | 0,176         | CC vs TT/CT |
| TT                                 | 1 (5)                       | 4 (16)                   | 4,2 (0,5-54,6)         | 0,343         | CC vs TT    |
| C                                  | 63 (90)                     | 37 (74)                  | <b>5,5 (1,7-16,2)</b>  | <b>0,002</b>  | C vs T      |
| T                                  | 4 (10)                      | 13 (26)                  |                        |               |             |

**Legenda:** VAF: frequência alélica variante. \*Em desequilíbrio de ligação estreito com o haplótipo 46/1.

### Haplótipos identificados

O DL dos SNVs está demonstrado na figura 1, sendo a variante *rs59720809* ausente na análise devido à baixa frequência nos grupos estudados. Essas alterações genéticas, quando pareadas, originam oito haplótipos (tabela 7). A análise dos haplótipos revelou que apenas o haplótipo 2 (*rs10974944G/rs10815151C/rs1011004A/rs77375493T*) apresentou frequência significativamente maior em indivíduos com o fenótipo PV (33,3%; OR: 3,3; IC 95%: 1,2-9,2;  $p = 0,0006$ ). O haplótipo 1 demonstra-se como possível marcador associado a PV e *JAK2V617<sup>+</sup>*.



**Figura 1:** Estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) do íntron 12 de *JAK2* em pacientes com policitemia vera (PV) e trombocitemia essencial (TE). Números nas caixas indicam o valor do coeficiente de correlação de LD ( $r^2$ ) multiplicado por 100. As tendências da caixa em direção ao branco indicam valor de  $r^2$  diminuído, LD forte representado pela caixa cinza-escuro. Um discreto DL é observado entre *rs10974944* e *rs10815151*; *rs10974944* e *rs10119004*; e *rs10974944* e *rs77375493* (*JAK2V617F*).

**Tabela 7:** Haplótipos do íntron 12 do gene *JAK2* presente em indivíduos com policitemia vera (PV) e trombocitemia essencial (TE)

| Haplótipo | <i>rs10974944</i> | <i>rs10815151</i> | <i>rs10119004</i> | <i>rs77375493</i> | PV            | TE            | Qui-quadrado  | Odds ratio                     | Valor de p    |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| 1         | C                 | C                 | G                 | G                 | 6<br>(15,3%)  | 17<br>(27,8%) | 3,246         | 0,4<br>(0,1-1,2)               | 0,07          |
| 2         | G                 | C                 | A                 | T                 | 13<br>(33,3%) | 8<br>(13,1%)  | <b>11,918</b> | <b>3,3</b><br><b>(1,2-9,2)</b> | <b>0,0006</b> |
| 3         | G                 | C                 | A                 | G                 | 6<br>(15,3%)  | 14<br>(22,9%) | 1,894         | 0,6<br>(0,2-1,7)               | 0,168         |
| 4         | C                 | T                 | A                 | G                 | 6<br>(15,3%)  | 12<br>(21,3%) | 0,495         | 0,7<br>(0,2-2,2)               | 0,481         |
| 5         | C                 | C                 | A                 | G                 | 1<br>(2,5)    | 3<br>(4,9%)   | 1,006         | 0,5<br>(0,03-3,5)              | 0,315         |
| 6         | C                 | T                 | A                 | T                 | 2<br>(5,1)    | 2<br>(3,2)    | 1,14          | 1,5<br>(0,2-10,4)              | 0,285         |
| 7         | C                 | C                 | G                 | T                 | 2<br>(5,1)    | 2<br>(3,2)    | 0,28          | 1,5<br>(0,2-10,4)              | 0,597         |
| 8         | C                 | T                 | A                 | G                 | 1<br>(2,5)    | 1<br>(1,6)    | 0,035         | 1,6<br>(0,08-31,2)             | 0,851         |
| 9         | G                 | C                 | G                 | G                 | 1<br>(2,5)    | 1<br>(1,6)    | 0,004         | 1,6<br>(0,08-31,2)             | 0,949         |

## Discussão

As neoplasias mieloproliferativas possuem alterações laboratoriais características bem como achados genéticos que permitem a sua identificação e diferenciação. Os achados envolvendo alterações genéticas em íntrons ainda não são totalmente compreendidos, mas esse cenário ganha cada vez mais visibilidade para compreensão etiológica dessas doenças e o papel dessas regiões do DNA nas NMPs.

A presente pesquisa é a primeira a analisar as variantes do íntron 12, em especial *rs10974944* (C>G), em uma população da Amazônia Brasileira. Além disso, o trabalho tornou possível a caracterização clínico-laboratorial da população estudada. A faixa etária dos indivíduos estabeleceu-se entre a quinta e sétima década de vida, ponto concordante com outros estudos<sup>19-21</sup>. O acúmulo progressivo de variações genéticas em células-tronco hematopoiéticas e maquinaria biológica de sistema de reparo do DNA<sup>21-23</sup>, aumento ou diminuição dos

telômeros<sup>24-27</sup> e exposição cumulativa a fatores de risco ao longo da vida como tabagismo e obesidade<sup>28,29</sup> podem explicar o protagonismo dessa faixa etária dentro do contexto das NMPs.

Em relação às características clínicas, policitemia vera (PV) apresentou proporção equilibrada de homens e mulheres, enquanto trombocitemia essencial (TE) evidenciou uma maioria de mulheres diagnosticadas, ambos em consonância com a literatura especializada<sup>30,31</sup>. Estudos demonstram que indivíduos do sexo feminino possuem risco aumentado de desenvolver neoplasias mieloproliferativas<sup>32</sup> e maior probabilidade de desenvolver complicações cardiovasculares e esplenomegalia<sup>29</sup>. A razão desse risco é incerta, porém alterações em cromossomos sexuais, fatores hormonais e expressão de genes podem ser possíveis contribuintes desse processo<sup>31</sup>.

TE mostrou-se a neoplasia mieloproliferativa mais frequente, o que está de acordo com o perfil descrito por Macedo *et al.*<sup>33</sup> que também estudou populações brasileiras com neoplasias mieloproliferativas no estado do Paraná e São Paulo. Questão notada em outras populações<sup>34,35</sup>. Características laboratoriais, eventos trombóticos e hemorrágicos apresentaram-se de acordo com o esperado para cada neoplasia: PV demonstrou maior predomínio de valores elevados na linhagem eritrocitária, TE evidenciou alterações na série megacariocítica, maior risco de eventos hemorrágicos e trombócitos e MF manifestou as maiores alterações do coagulograma, como descreve a OMS<sup>3,36</sup> e outras fontes científicas<sup>30,37</sup>.

Em relação aos achados genéticos, a PV destaca-se como a NMP com a maioria dos casos positivos para a variante *JAK2V617F*, uma vez que está associada diretamente com a patogênese específica dessa malignidade hematológica<sup>38</sup> e tem papel na ativação constitutiva da via JAK-STAT<sup>39</sup>. É interessante notar que 58% da nossa população com PV foi positiva para a variante, a princípio, pode diferir dos achados comumente descritos na literatura, os quais apontam frequências de *JAK2V617F* acima de 70% em pacientes brasileiros<sup>40</sup>, coreanos<sup>41</sup>, chineses<sup>42</sup>, japoneses<sup>43,44</sup> e indivíduos de origem europeia<sup>45-47</sup>.

Uma questão que responde sobre o quantitativo de pacientes PV *JAK2V617F*<sup>+</sup> está relacionado à terapêutica. Alguns pacientes incluídos no estudo passaram por terapia citorrredutora, que tem como mecanismo a supressão/diminuição da carga variante de *JAK2V617F*<sup>+</sup> por meio da inibição do processo mieloproliferativo de células hematopoéticas mutadas, como notado em estudo recente<sup>48</sup>. Isso afeta diretamente a sensibilidade dos métodos de detecção molecular utilizados para identificar a variante, tornando ainda mais importante a incorporação da análise molecular para *JAK2V617F* nas suspeitas iniciais para NMPs, conforme estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>3,36</sup>.

O haplótipo da linha germinativa 46/1, identificado pela variante *rs10974944* (C>G), possui uma associação com *JAK2V617F* bem documentada na literatura<sup>14,33,49,50</sup> questão também observada em nosso estudo. A elevada frequência do alelo G de *rs10974944* em indivíduos positivos para *JAK2V617F* contribui para discussões sobre a correlação não aleatória entre essas duas alterações genéticas<sup>16,45</sup>. Essa relação vai ao encontro de um outro achado de nosso estudo, o haplótipo 2 (*rs10974944G/rs10815151C/rs1011004A/rs77375493T*), o qual fortalece os conceitos pautados na interação entre *rs10974944* (C>G) e *rs77375493* (G>T) (*JAK2V617F*). Essas proposições estão em consonância com os achados envolvendo o 46/1 em outras populações brasileiras<sup>33,51</sup>, taiwanesa<sup>52</sup>, europeias<sup>53</sup>, chinesas<sup>54</sup> e japonesas<sup>44</sup>, logo, os possíveis mecanismos que antecedem à aquisição de *JAK2V617F* não está limitado apenas a um grupo étnico específico, portanto, sua base evolutiva pode ser relativamente antiga<sup>55</sup>.

Estudos relatam um maior risco de indivíduos com genótipo GG de *rs10974944* serem positivos para *JAK2V617F*<sup>33,45,56</sup>. Assim como nos estudos anteriormente citados, nossa população apresentou um risco quatro vezes maior (OR: 4,1; IC 95%: 8-13,9). Esses achados apoiam a hipótese da hipermutabilidade, que estabelece o haplótipo 46/1 como um agente desregulador do gene *JAK2*, o qual eleva o risco de erros de replicação de DNA e condiciona um cenário mutagênico para aquisição de variantes com vantagem seletiva, como *JAK2V617F*<sup>15,57,58</sup>.

A associação de *rs10974944* (G) e VAF de *JAK2V617F* nos permite hipotetizar sobre um possível envolvimento do haplótipo 46/1 na expansão clonal o que, de fato, demonstrou-se uma associação significativa. Identificamos um risco seis vezes maior de indivíduos portadores do alelo G de *rs10974944* e VAF *JAK2V617F*  $\geq 50\%$ . Nossos dados indicam que o marcador do haplótipo 46/1 pode ter um papel não só na aquisição de *JAK2V617F*, mas também na sua expansão clonal, manutenção e sobrevivência, como relatado anteriormente<sup>45</sup>. Tefferi *et al.*<sup>59</sup> sugerem que *JAK2V617F* não é o evento clonogênico inicial nas NMPs mas sim um dos vários subclones derivados de um clone ancestral. Isso corrobora com os apontamentos de Pardanani *et al.*<sup>60</sup>, que sustentam a tese de que este haplótipo está alocado em um ambiente regulatório *cis* favorável, facilita a aquisição de *JAK2V617F* que, por sua vez, é responsável pela expansão clonal e o desenvolvimento da NMP.

Além disso, não se pode descartar o possível papel da dissomia uniparental adquirida, evento genético que leva uma recombinação mitótica associada à perda neutra de heterozigossidade do cromossomo 9p em pacientes NMPs, reduzindo tanto o haplótipo quanto *JAK2V617F* a um estado homozigoto<sup>13,61,62</sup>. Nesse contexto, células com ambas as variantes possuem, em teoria, uma vantagem seletiva, o que condiciona um maior potencial

mieloproliferativo e favorece o estabelecimento das células variantes sobre as células saudáveis, o que explicaria o aumento da VAF nos indivíduos com a combinação *rs10974944* G + *rs77375493* T (*JAK2V617F*) em homozigose.

Associação entre a elevação de índices hematológicos e a presença de 46/1 é observada na literatura<sup>33,63</sup>, todavia, isso não é consenso entre a comunidade científica<sup>11,56,64</sup>. Nossos dados apresentam diferenças significativas nos valores de VCM, HCM na PV e RBC, Hb e Ht na TE portadores do alelo G de *rs10974944*, o que já foi observado em estudos anteriores<sup>33,60,63</sup>.

As outras variantes genéticas *rs59720809* (A>G), *rs10119004* (A>G) e *rs10815151* (C>T) não apresentaram relação com aumento ou diminuição de parâmetros laboratoriais, sejam elas analisadas de forma isolada ou conjuntamente. *rs59720809*, até o momento, não foi relatada em estudos envolvendo NMPs e apresentou uma baixa frequência nas três neoplasias avaliadas. *rs10119004* apresentou maior frequência em TE, mas não demonstrou associação de risco para ambos os grupos *JAK2V617F*<sup>+</sup> e *JAK2V617F*<sup>-</sup>, diferente de um estudo realizado em uma população chinesa de Hong Kong<sup>42</sup>. *rs10815151* (T) apresentou maior frequência em indivíduos *JAK2V617F*<sup>-</sup> e os genótipos CT e TT/CT demonstraram associação de proteção à *JAK2V617F* e VAF < 50%, todavia, mais estudos são necessários para estabelecer essa possível relação.

Considerando que anormalidades de *splicing* provavelmente desempenham um papel nas NMPs<sup>65</sup>, levantamos a hipótese de que a variante *rs10815151* possa exercer um efeito indireto na expressão ou regulação do gene *JAK2*. Essa alteração genética pode, teoricamente, modular a estrutura ou função de elementos regulatórios ainda desconhecidos localizados no íntron 12, afetando a ligação de fatores de transcrição ou o processo de *splicing* alternativo. Essas alterações poderiam levar a modificações na expressão ou no processamento do mRNA, resultando em uma redução na quantidade ou funcionalidade da proteína. Como consequência, essa redução poderia limitar a capacidade de *JAK2V617F* de desempenhar sua função patogênica.

Ressalta-se que não há dados sobre essa relação descrita na literatura, sendo necessários estudos com maiores populações, testes funcionais para *rs10815151* e análise de correlações com, por exemplo, a variante de *splicing* *JAK2*  $\Delta$ exon14 já identificada em NMPs negativos para *JAK2V617F*<sup>66</sup> ou até mesmo genes spliceossomais associados a NMPs<sup>65,67,68</sup> como *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2* e *PRPF8* para compreender os mecanismos envolvidos nesse complexo processo.

Os resultados desse estudo mostram que a variante *rs10974944* (G) está associado a neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas, positivas para *JAK2V617F*, em especial

PV, elevada carga alélica variante desses pacientes e alterações hematológicas. O haplótipo *rs10974944G/rs10815151C/rs1011004A/rs77375493T* apresentou-se como um fator relacionado a PV. Já a variante *rs10815151* demonstrou comportamento antagônico à *JAK2V617F* e VAF, sendo necessário outros estudos para verificar essa possível relação.

## Referências

1. Journal, B., Freitas, R. M. De & Magno, C. Myeloproliferative neoplasms and the JAK / STAT signaling pathway: an overview. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **37**, 348–353 (2015).
2. Zerbini, M. C. N. *et al.* Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: Padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4 a edição. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **47**, 643–648 (2011).
3. Swerdlow, S. H. *et al.* *World Health Organization Classification of Tumours This book and all other volumes of the series can be purchased : From all countries. World Health Organization* (2017).
4. Khoury, J. D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* (2022) doi:10.1038/s41375-022-01613-1.
5. Pagliarini-e-Silva, S. Estudo da frequência dos haplótipos do gene JAK2 em pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas crônicas. (Universidade Estadual de Maringá, 2011).
6. Stuckey, R. & Gómez-Casares, M. T. Recent advances in the use of molecular analyses to inform the diagnosis and prognosis of patients with polycythaemia vera. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
7. Monte-Mór, B. C. R. & Costa, F. F. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **30**, (2008).
8. Nielsen, C., Bojesen, S. E., Nordestgaard, B. G., Kofoed, K. F. & Birgens, H. S. *JAK2V617F* somatic mutation in the general population: Myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica* **99**, 1448–1455 (2014).
9. Transformation, M. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation Florian. *Cells* **1** (2019).
10. Meireles, C. F. A. Doenças mieloproliferativas. *Fundamentos em hematologia* (Universidade do Porto, 2011).
11. Andrikovics, H. *et al.* JAK2 H. *et al.* JAK2 46/1 haplotype analysis in myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia. *Leukemia* **24**, 1809–1813 (2010).
12. Trifa, A. P., Cucuianu, A. & Popp, R. A. Development of a reliable PCR-RFLP assay for investigation of the JAK2 *rs10974944* SNP, Which might predispose to the acquisition of somatic mutation *JAK2V617F*. *Acta Haematol.* **123**, 84–87 (2010).
13. Jones, A. V. *et al.* JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 446–449 (2009).
14. Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G. & Albano, F. The JAK2 GGCC 46/1 haplotype in myeloproliferative neoplasms: Causal or random? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–12 (2018).
15. Campbell, P. J. Somatic and germline genetics at the JAK2 locus. *Nat. Methods* **41**, 385–386 (2009).
16. Paes, J., Silva, G. A. V., Tarragô, A. M. & Mourão, L. P. d. S. The Contribution of JAK2 46/1 Haplotype in the Predisposition to Myeloproliferative Neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 20 (2022).
17. Sud, A. *et al.* Familial risks of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myeloproliferative neoplasms. *Blood* **132**, 973–976 (2018).
18. Landgren, O. *et al.* 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* **112**, 2199–2204 (2008).
19. Szuber, N. *et al.* Myeloproliferative neoplasms in the young: Mayo Clinic experience with 361 patients age 40 years or younger. *Am. J. Hematol.* **93**, 1474–1484 (2018).
20. Büyükaşık, Y. *et al.* Polycythemia vera: Diagnosis, clinical course, and current management. *Turkish J. Med. Sci.* **48**, 698–710 (2018).
21. Azevedo, A. N. A. P. *et al.* DNA repair genes polymorphisms and genetic susceptibility to Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms in a Portuguese population: The role of base excision repair genes polymorphisms. 4641–4650 (2017) doi:10.3892/ol.2017.6065.
22. Chen, E. *et al.* *JAK2V617F* promotes replication fork stalling with disease-restricted impairment of the intra-

- S checkpoint response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15190–15195 (2014).
23. Constantinescu, S. N., Vainchenker, W., Levy, G. & Papadopoulos, N. Functional Consequences of Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. *HemaSphere* (2021) doi:10.1097/HS9.0000000000000578.
24. Ferrer, A., Mangaonkar, A. A. & Patnaik, M. M. Clonal Hematopoiesis and Myeloid Neoplasms in the Context of Telomere Biology Disorders. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 61–68 (2022) doi:10.1007/s11899-022-00662-8.
25. Bao, E. L. *et al.* Inherited myeloproliferative neoplasm risk affects haematopoietic stem cells. *Nature* vol. 586 (2020).
26. Rumi, E. *et al.* Familial chronic myeloproliferative disorders: Clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5630–5635 (2007).
27. Barraco, D. *et al.* Gender effect on phenotype and genotype in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: results from the MYSEC project. *Blood Cancer J.* **8**, 10–13 (2018).
28. Duncombe, A. S. *et al.* Modifiable Lifestyle and Medical Risk Factors Associated With Myeloproliferative Neoplasms. *HemaSphere* 1–6 (2020).
29. Allahverdi, N., Yassin, M. & Ibrahim, M. Environmental Factors , Lifestyle Risk Factors , and Host Characteristics Associated With Philadelphia Negative Myeloproliferative Neoplasm : A Systematic Review. *Cancer Control* **28**, 1–12 (2021).
30. Vannucchi, A. M. & Harrison, C. N. Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* **129**, 693–703 (2017).
31. Geyer, H. L. *et al.* Associations between gender, disease features and symptom burden in patients with myeloproliferative neoplasms : an analysis by the MPN QOL International Working Group. *Haematologica* **102**, 85–93 (2017).
32. Patterson-Fortin, J. & Moliterno, A. R. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Influence of Age and Gender. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **12**, 424–431 (2017).
33. Macedo, L. C. *et al.* JAK2 46/1 haplotype is associated with JAK2 V617F - positive myeloproliferative neoplasms in Brazilian patients. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, 654–660 (2015).
34. Harrison, C. N. *et al.* The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: results from the international MPN Landmark survey. *Ann. Hematol.* **96**, 1653–1665 (2017).
35. Varghese, C., Immanuel, T., Ruskova, A., Theakston, E. & Kalev-Zylinska, M. L. The epidemiology of myeloproliferative neoplasms in new zealand between 2010 and 2017: Insights from the new zealand cancer registry. *Curr. Oncol.* **28**, 1544–1557 (2021).
36. WHO Classification of Haematolymphoid Tumours, 5th edition, 2022. *Leukemia* (2022).
37. Jimenez, S. Neoplasias mieloproliferativas Myeloproliferative neoplasms. *Acta médica Colomb.* **42**, 15–17 (2017).
38. Venugopal, S. & Mascarenhas, J. Novel therapeutics in myeloproliferative neoplasms. *J. Hematol. Oncol.* 1–13 (2020) doi:10.1186/s13045-020-00995-y.
39. Torres, D. G. *et al.* JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Biomolecules* vol. 12 1–18 (2022).
40. Porto-Soares, M. A. *et al.* Clinical and molecular profile of a Brazilian cohort of patients with classical *BCR::ABL1*-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* **42**, 238–244 (2020).
41. Park, C. H. *et al.* High frequency of JAK2 exon 12 mutations in Korean patients with polycythemia vera: Novel mutations and clinical significance. *J. Clin. Pathol.* **69**, 737–741 (2016).
42. Koh, S. P. *et al.* Genetic association between germline JAK2 polymorphisms and myeloproliferative neoplasms in Hong Kong Chinese population: A case-control study. *BMC Genet.* **15**, 1–12 (2014).
43. Tanaka, M. *et al.* JAK2 46/1 haplotype is associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms in Japanese patients. *Int. J. Hematol.* **97**, 409–413 (2013).
44. Ohyashiki, J. H. *et al.* The C allele of JAK2 rs4495487 is an additional candidate locus that contributes to myeloproliferative neoplasm predisposition in the Japanese population. *BMC Med. Genet.* **13**, 6 (2012).
45. Trifa, A. P. *et al.* The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Ann. Hematol.* **89**, 979–983 (2010).
46. Jones, A. V. *et al.* Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* **106**, 2162–2168 (2005).
47. Trifa, A. P. *et al.* MECOM, HBS1L-MYB, THRB-RARB, JAK2, and TERT polymorphisms defining the genetic predisposition to myeloproliferative neoplasms: A study on 939 patients. *Am. J. Hematol.* **93**, 100–106 (2017).
48. Harrison, C. *et al.* Effects of Tamoxifen on the Mutant Allele Burden and Disease Course in Patients with Myeloproliferative Neoplasms - Results of the Tamarin Study. (2020) doi:10.1182/blood-2020-134764.

49. Olcaydu, D. *et al.* A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 450–454 (2009).
50. Kilpivaara, O. *et al.* A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of *JAK2V617F*-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 455–459 (2009).
51. Pagliarini-e-Silva, S. *et al.* Evaluation of the association between the JAK2 46/1 haplotype and chronic myeloproliferative neoplasms in a Brazilian population. *Clinics* **68**, 5–9 (2013).
52. Chiang, Y., Chang, Y., Lin, H. & Huang, L. Germline variations at JAK2, TERT, HBS1L-MYB and MECOM and the risk of myeloproliferative neoplasms in Taiwanese population. *Oncotarget* **8**, 76204–76213 (2017).
53. Lighezan, D. L. *et al.* TET2 rs1548483 SNP associating with susceptibility to molecularly annotated polycythemia vera and primary myelofibrosis. *J. Pers. Med.* **10**, 1–16 (2020).
54. Zhang, X. *et al.* The JAK2 46/1 haplotype is a risk factor for myeloproliferative neoplasms in Chinese patients. *Int. J. Hematol.* **96**, 611–616 (2012).
55. Jones, A. V. & Cross, N. C. P. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther. Adv. Hematol.* **4**, 237–253 (2013).
56. Tapper, W. *et al.* Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
57. 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* **96**, 1575–1579 (2011).
58. Masselli, E., Pozzi, G., Carubbi, C. & Vitale, M. The genetic makeup of myeloproliferative neoplasms: Role of germline variants in defining disease risk, phenotypic diversity and outcome. *Cells* **10**, (2021).
59. Tefferi, A. *et al.* JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygosity for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia* 105–109 (2010) doi:10.1038/leu.2009.225.
60. Pardanani, A. *et al.* The JAK2 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of *JAK2V617F* mutational status clinical correlates in a study of 226 consecutive patients. *Leukemia* **24**, 110–114 (2010).
61. Kralovics, R., Guan, Y. & Prchal, J. T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* **30**, 229–236 (2002).
62. Sullivan, J. O. & Mead, A. J. Heterogeneity in myeloproliferative neoplasms: Causes and consequences. *Adv. Biol. Regul.* **71**, 55–68 (2018).
63. Martínez-Trillos, A. *et al.* Relationship between the 46/1 haplotype of the JAK2 gene and the JAK2 mutational status and allele burden, the initial findings, and the survival of patients with myelofibrosis. *Ann. Hematol.* **93**, 797–802 (2014).
64. Oddsson, A. *et al.* The germline sequence variant rs2736100-C in TERT associates with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* vol. 28 1371–1374 (2014).
65. Hautin, M., Bernard, D. G., Corcos, L. & Lippert, E. Splicing Anomalies in Myeloproliferative Neoplasms: Paving the Way for New Therapeutic Venues. 1–22 (2020).
66. Ma, W. *et al.* JAK2 exon 14 deletion in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *PLoS One* **5**, 8–14 (2010).
67. Courtier, F. *et al.* Genomic analysis of myeloproliferative neoplasms in chronic and acute phases. *Haematologica* **102**, 11–14 (2017).
68. Brecqueville, M. *et al.* Mutation Analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in Myeloproliferative Neoplasms. *Genes. Chromosomes Cancer* **000**, (2012).



**CAPÍTULO IV:**

**Fatores genéticos associados à regulação das doenças mieloproliferativas *BCR::ABL1*–:  
uma abordagem feita na população da Amazônia brasileira**

**Artigo original a ser submetido na revista *Scientific Reports*  
(ISSN 2045-2322)**

Fator de Impacto: 4,99 Qualis CAPES A1

## Fatores genéticos associados à regulação das doenças mieloproliferativas *BCR::ABL1*–: uma abordagem feita na população da Amazônia brasileira

Jhemerson F. Paes<sup>1</sup>, Dania G Torres<sup>1</sup>, George A. V. Silva<sup>1,3,4</sup>, Andréa M. Tarragô<sup>1,2,4</sup>, Lucivana P. de Souza Mourão<sup>1,5\*</sup>

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

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

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

4 Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Manaus, AM, Brasil

5 Escola Superior em Ciências da Saúde (ESA/UEA), Manaus 69065-001, AM, Brasil.

\***Autor correspondente:** Lucivana P. de Souza Mourão Escola Superior em Ciências da Saúde (ESA/UEA), Av. Carvalho Leal, 1777 - Cachoeirinha, Manaus - AM, 69065-001. E-mail: lpsouza@uea.edu.br

### RESUMO

As neoplasias mieloproliferativas são malignidades hematológicas caracterizadas por hiperplasias dos elementos da linhagem mieloides. Alterações genéticas desempenham papel importante nessas doenças, especialmente *JAK2V617F*, presente em 95% dos casos de policitemia vera, e em 50-60% dos casos de trombocitemia essencial e mielofibrose. Estudos recentes têm destacado a complexidade molecular dessas neoplasias, destacando o papel de variantes genéticas no gene regiões regulatórias, como o promotor gênico de *JAK2*. Este estudo teve como objetivo identificar variantes no promotor do gene *JAK2* em uma população da Amazônia brasileira diagnosticada com neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1*– e realizar associações com *JAK2V617F*, frequência alélica variante e variantes do intron 12 (haplótipo 46/1 e *rs10815151*). Foram analisados dados clínicos e laboratoriais de 108 pacientes (policitemia vera: n=39; trombocitemia essencial: n=61; e mielofibrose: n=8). As amostras de sangue foram coletadas e o DNA foi extraído para a realização da PCR e sequenciamento. Cinco variantes de nucleotídeo único foram identificadas *rs189703877* (A>C), *rs73389454* (A>C), *rs1887428* (G>C) e *rs1887429* (G>T) e *rs6476933* (C>T). O alelo G de *rs1887428* demonstrou associação significativa com *JAK2V617F*+ VAF≥50%, ao passo que o alelo variante (C) tem relação inversa. *rs6476933* (C>T) e *rs1887429* (G>T) criam sítios de fatores de transcrição, mas com proteínas relacionadas até o momento desconhecidas, o que demonstra necessidade de estudos funcionais para verificar o papel dessas variantes. Esses resultados sugerem que as variantes no promotor do gene *JAK2* podem desempenhar um papel no desenvolvimento e progressão das NMPs.

**Palavras chaves:** *JAK2*, neoplasias mieloproliferativas crônicas, regiões promotoras genéticas, polimorfismos de nucleotídeo único.

### Introdução

As neoplasias mieloproliferativas são doenças hematológicas caracterizadas pela produção exacerbada de elementos da linhagem mieloide, sem comprometer o processo de diferenciação e maturação celular<sup>1-3</sup>. As malignidades hematológicas mais comuns nesse grupo

são a trombocitemia essencial, a policitemia vera e a mielofibrose, que são diferenciadas por achados clínicos, laboratoriais e genéticos<sup>4,5</sup>.

No contexto etiopatogênico dessas doenças, as alterações genéticas desempenham um papel significativo, em particular a variante missense *JAK2V617F*, que resulta na substituição de valina por fenilalanina no códon 617 de *JAK2*<sup>6,7</sup>. Essa alteração confere atividade constitutiva à proteína *JAK2*, levando a uma ativação exacerbada da via e à produção aumentada de plaquetas, eritrócitos e granulócitos, resultando no fenótipo mieloproliferativo<sup>8-10</sup>.

A variante *JAK2V617F* está presente em 95% dos casos de policitemia vera e em 50-60% dos casos de trombocitemia essencial e mielofibrose<sup>11</sup>. Ela é considerada um evento genético chave nas neoplasias mieloproliferativas, seguida por alterações nos genes *MPL* e *CALR*<sup>12-14</sup>. Contudo, estudos têm demonstrado o papel de outros genes e variantes genéticas no processo de iniciação, progressão e estabelecimento dessas doenças, destacando a complexidade molecular envolvida<sup>12,15,16</sup>. O próprio gene *JAK2* possui uma relação complexa com essas neoplasias, apresentando outras variantes além de *JAK2V617F*, como variantes no éxon 12<sup>17,18</sup> e variantes nos íntrons (como o haplótipo 46/1), que estão relacionadas a casos familiares, esplenomegalia, trombose da veia porta e síndrome de Budd-Chiari em pacientes com neoplasias mieloproliferativas<sup>17,19-23</sup>.

O estudo de alterações genéticas no promotor gênico tem se tornado cada vez mais relevante na prática médica, auxiliando na compreensão dos conceitos etiológicos de doenças complexas, especialmente neoplasias<sup>24-26</sup>. Essas alterações podem acelerar ou iniciar quadros patológicos, bem como exercer um papel protetor, através de mecanismos como metilação e alteração de sítios de fatores de transcrição<sup>27,28</sup>. No entanto, esses conceitos ainda são pouco explorados nas neoplasias mieloproliferativas, e pouco se sabe sobre as possíveis variantes identificadas nessas regiões genéticas e seu impacto clínico nos pacientes.

Diante dessas premissas, o objetivo deste estudo foi identificar variantes localizadas na região promotora do gene *JAK2* em uma população da Amazônia brasileira diagnosticada com neoplasias mieloproliferativas negativas para *BCR::ABL1*. As variantes identificadas foram avaliadas em relação à sua distribuição nas neoplasias, ao status de *JAK2V617F*, à frequência alélica variante e ao status do haplótipo 46/1 (*rs10974944*), bem como a uma variante *rs10815151* presente no íntron 12 (dados não publicados).

## **Materiais e métodos**

**População:** Foram incluídos 108 indivíduos com diagnóstico clínico para neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas. O estudo foi realizado de fevereiro de 2021 a janeiro de 2023. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hospitalar em Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. O consentimento informado por escrito foi obtido de paciente ou de um substituto apropriado se o paciente não conseguiu fornecer consentimento. Este estudo atendeu a resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos com parecer: nº 4.450.813 e certificado de apresentação de apreciação ética nº 39991420.6.0000.0009.

**Dados clínicos e laboratoriais:** Os dados clínicos (sexo, idade) foram obtidos por meio de prontuários médicos e os dados laboratoriais foram obtidos através dos resultados prévios obtidos através da pesquisa de Torres e colaboradores (dados não publicados).

**Amostra biológica e extração de DNA:** amostras de sangue venoso coletadas em tubos com EDTA. O DNA foi extraído com Brazol (*Lgcbio, Brasil*) conforme orientações do fabricante. Em seguida armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**PCR convencional e purificação do amplicon:** para a amplificação da região estudada, utilizou-se uma reação com volume final de 25  $\mu\text{L}$  com 50-100 ng de DNA genômico, tampão (1x),  $\text{MgCl}_2$  (2.5mM), Primer FW (GTCATGGGACTGGTTCATTCTCATC) e RV (TTTCGGCTTTTCCTTCCACCTCC) (0.4 mM), dNTP mix (0.2 mM) e TAQ 1U/ $\mu\text{L}$ . Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados na plataforma Primer-BLAST-NCBI e OligoAnalyzer Tool-IDTDNA.com. Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose à 1,5%, corado com brometo de etídio. O produto da PCR, um amplicon com 673 pb, foi purificado com Polietilenglicol 8000 (*Promega*).

**Sequenciamento dos nucleotídeos e análise de seqüências:** Aproximadamente 5-30 ng de produto de PCR purificado foi aplicado na reação de sequenciamento. O sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado usando BigDye® *Terminator* v3.1 (*Applied Biosystems*), seguindo recomendações do fabricante e os primers descritos anteriormente. Os produtos foram purificados pelo protocolo de EDTA/Etanol, e avaliados no sequenciador automático 3500 XL *Genetic Analyzer*® (*Applied BioSystems, USA*), com polímero POP-7. As seqüências foram inicialmente analisadas no software *Sequencing Analysis* (*Applied biosystem [Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil]*). Software *Geneious* 6.0.6 (*Biomatters, USA*) usado para fazer o mapeamento das variantes e comparação com a seqüência de referência *Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2)*, (NCBI: NG\_009904.1).

**Análise dos haplótipos:** frequências dos haplótipos foram calculadas usando o software Haploview (v.4.2), como medida do Desequilíbrio de Ligação (DL). Haplótipos com frequências <1% não foram considerados relevantes para comparações realizadas. O grau de *pairwise* entre os nucleotídeos foi analisado pela estrutura LD, considerando valores de  $r^2 > 0,8$  como DL forte,  $< 0,8$  para fraco e  $< 0,1$  como DL negativo.

**Análise estatística:** Os resultados foram analisados inicialmente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%), e foram testadas pelo Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) e teste exato de Fisher com intervalo de confiança de 95%. Variáveis numéricas foram expressas por mediana (Md) e intervalo interquartilício [IIQ] com percentil de 75% através do software GraphPad Prism v.9.0.2. Para as variáveis não paramétricas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Para ambas as análises foi realizado o pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações, também pelo software GraphPad Prism v.9.0.2. Valores de  $p < 0.05$  consideraram-se estatisticamente significativos.

## Resultados

Foram incluídos um total de 108 pacientes: 36,1% (n=39) diagnosticados com policitemia vera (PV), 56,4% (n=61) com trombocitemia essencial (TE) e 7,4% (n=8) com mielofibrose (MF), com idade entre a quinta e a sexta década de vida.

Acerca dos dados moleculares desses pacientes, 41,6% (n=45) apresentaram a variante *JAK2V617F*. Dentre esses pacientes com a variante *JAK2V617F*, 44,4% (n=20) apresentaram frequência alélica variante acima de 50%. Além disso, 63% (n=63) apresentaram o haplótipo 46/1, que está em desequilíbrio de ligação completo com a variante *rs10974944* (G), e 42% (n=42) apresentaram a variante *rs10815151* (C>T), um SNV presente no íntron 12 do gene *JAK2*.

No entanto, em relação à investigação molecular, nenhum paciente com mielofibrose (MF) apresentou as variantes avaliadas, o que justificou a sua exclusão das análises posteriores. Os dados detalhados sobre a distribuição das variantes em relação ao tipo de doença mieloproliferativa (NMP), status de *JAK2V617F* e frequência alélica variante (VAF) podem ser encontrados na tabela 1.

## Distribuição nas NMPs

Cinco variantes de nucleotídeo único foram identificadas na região promotora, com suas características descritas no quadro 1. *rs189703877* (A>C), *rs73389454* (A>C), *rs1887428*

(G>C) e *rs1887429* (G>T) estão localizadas dentro de ilhas CpG. Já as alterações *rs6476933* (C>T), *rs1887428* (G>C) e *rs1887429* (G>T) estão associadas a sítios de fatores de transcrição.

**Quadro 1:** Caracterização de variantes identificadas na região promotora.

| SNV                | Alelo variante | Posição genômica (NG_009904.1) | MAF <sup>1</sup> | Sequência de referência   | Sequência variante  | Ilha CpG <sup>2</sup> | Sítio de fator de transcrição <sup>3</sup> |
|--------------------|----------------|--------------------------------|------------------|---|---|-----------------------|--|
| <i>rs6476933</i>   | T              | -1093                          | 28%              | 5'...AAAAC <b>T</b> TATG...3'<br>3'...CTTT <b>T</b> GATACG...5' | 5'...AAAAT <b>T</b> TATG...3'<br>3'...TTTT <b>A</b> ATAC...5' | Não                   | Sim  |
| <i>rs189703877</i> | C              | -927                           | 4%               | 5'...AGACA <b>C</b> TCA...3'<br>3'...TCTG <b>T</b> GAGT...5'    | 5'...AGACC <b>C</b> TCA...3'<br>3'...TCTGG <b>G</b> GAGT...5' | Sim                   | Não  |
| <i>rs73389454</i>  | C              | -727                           | 1,5%             | 5'...GCCA <b>A</b> GGGT...3'<br>3'...CGGT <b>T</b> CCCA...5'    | 5'...GCCA <b>C</b> GGGT...3'<br>3'...CGGT <b>G</b> CCCA...5'  | Sim                   | Não  |
| <i>rs1887428</i>   | C              | -715                           | 52%              | 5'...TGAT <b>G</b> GGAG...3'<br>3'...ACTA <b>C</b> CCTC...5'    | 5'...TGAT <b>C</b> GGAG...3'<br>3'...ACTA <b>G</b> CCTC...5'  | Sim                   | Sim  |
| <i>rs1887429</i>   | T              | -696                           | 28%              | 5'...GAGG <b>G</b> CGC...3'<br>3'...CTCC <b>C</b> GCG...5'      | 5'...GAGG <b>T</b> CGC...3'<br>3'...CTCC <b>A</b> GCG...5'    | Sim                   | Sim  |

Legenda: SNV: single nucleotide variant, MAF: minor allele Frequency.

<sup>1</sup>Frequências obtidas a partir do ALFA Allele Frequency<sup>29</sup>. <sup>2</sup>O cálculo foi realizado na ferramenta online [https://www.bioinformatics.org/sms2/cpg\\_islands.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html). Uma janela de 200 pb é utilizada para percorrer a sequência em intervalos de 1 pb. As ilhas CpG são determinadas como intervalos de sequência em que o valor Obs/Exp é superior a 0,6 e o conteúdo de GC é superior a 50%. O número estimado de dímeros CpG em uma janela é obtido multiplicando-se o número de 'C's na janela pelo número de 'G's na janela e dividindo pelo comprimento da janela. <sup>3</sup>Dados obtidos na plataforma online SNPinfo (<https://snpinfo.nih.gov/snpinfo/snpfunc.html>)

Em relação a distribuição das variantes nas NMPs, para *rs6476933* (C>T), o alelo T apresentou-se mais frequente em pacientes com TE em (32%). Apenas a comparação entre CT vs CC mostrou uma associação significativa (OR: 0,3; IC 95%: 0,1-0,8; p = 0,035).

Em relação a *rs73389454* (A>C), os genótipos AA e AC apresentaram frequência similar entre os grupos. A frequência do alelo selvagem (A) foi de 96,2% em PV e 90,2% em TE, enquanto a frequência do alelo variante (C) foi de 3,8% e 9,8%, respectivamente.

No SNV *rs1887428* (G>C), os genótipos GC e CC foram mais prevalentes em TE (39,3% e 31,3%, respectivamente) ao passo que o alelo C foi mais frequente em TE (50,8%). Os genótipos GG e GT de *rs1887429* foram mais prevalentes em TE, enquanto o genótipo TT foi ligeiramente mais frequente em PV. A comparação entre os genótipos GT vs GG e apresentou-se significativa (OR: 0,2 IC 95%: 0,07-0,5; p = 0,002) e a frequência do alelo T foi similar entre TE e PV. Em *rs189703877* (A>C) não foram observadas diferenças significativas nos genótipos e alelos entre os grupos PV e TE (p > 0,05).

### Frequência e distribuição da *JAK2V617F*

Os dados de frequência e distribuição da variante *JAK2V617F* estão descritos na tabela. 93 pacientes apresentaram informações sobre o status *JAK2V617F+* (n=45) e *JAK2V617F-* (n=48).

A comparação CT/TT vs CC de *rs6476933* demonstrou associação significativa (OR: 0,3; IC 95%: 0,1-0,8; p = 0,034) em indivíduos *JAK2V617F-*, tal como os genótipos GC e CC do *rs1887428* (OR: 0,2; IC 95%: 0,1-0,6; p = 0,006 e OR: 0,1; IC 95%: 0,05-0,4; p = 0,001, respectivamente) e alelo C (OR: 0,3; IC 95%: 0,1-0,5; p = 0,0002). A variante *rs1887429* (G>T) demonstrou resultados similares, com os genótipos GT e o alelo T apresentando a mesma associação (OR: 0,2; IC 95%: 0,1-0,6; p = 0,006; OR: 0,4; IC 95%: 0,2-0,8; p = 0,014, respectivamente). Esses resultados sugerem que os alelos variantes de *rs1887428* (G>C) e *rs1887429* estão relacionados a uma menor probabilidade de um indivíduo apresentar a variante *JAK2V617F*.

Sobre a distribuição em relação ao status de *JAK2V617F*, os SNVs *rs189703877* (A>C) e *rs73389454* (A>C) não demonstraram associação significativa com o status de *JAK2V617F* (p > 0,005).

### Frequência alélica variante (VAF) de *JAK2V617F*

Dente as variantes estudadas, o genótipo selvagem (CC) de *rs6476933* foi mais frequente nos indivíduos com *JAK2V617FVAF*  $\geq 50\%$  em comparação com aqueles com *JAK2V617FVAF* <50% (85% vs. 60%, respectivamente), embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística (OR = 0,1; IC 95%: 0,01-0,9; p = 0,053). Não foram observadas diferenças significativas na frequência do alelo C e T de *rs6476933* entre *JAK2V617FVAF*  $\geq 50\%$  e *JAK2V617FVAF* <50% (p > 0,05), tal como observado em *rs189703877* (A>C) e *rs73389454* (A>C) (p > 0,05).

No caso da variante *rs1887428* (G>C), o genótipo GC foi mais frequente nos indivíduos com *JAK2V617FVAF* <50% em comparação com aqueles com *JAK2V617FVAF*  $\geq 50\%$  (52% vs. 10%, respectivamente), evidenciando uma associação significativa (OR = 0,1; IC 95%: 0,05-0,7; p = 0,015). A frequência do alelo C também foi maior nos indivíduos com *JAK2V617FVAF* <50% (38% vs. 20%, respectivamente; p = 0,070).

Em *rs1887429* (G>T), o genótipo GT foi mais frequente nos indivíduos com *JAK2V617FVAF* <50% (30,4%), apresentando uma associação significativa (OR = 0,2; IC 95%: 0,05-0,9; p = 0,053). Não foram observadas diferenças significativas na frequência do alelo T entre os dois grupos (p > 0,05).

**Tabela 1:** distribuição alélica e genotípica de SNVs do promotor de acordo com NMP, status de *JAK2V617F* e Frequência alélica variante.

| Genótipo ou alelo, n (%) | Neoplasias mieloproliferativas (n=100) |            |                |            | <i>JAK2V617F</i> (n=93)   |                           |                |            | Frequência alélica variante (VAF) <i>JAK2V617F</i> (n=45) |             |                |            |             |
|--------------------------|--|------------|----------------|------------|---------------------------|---------------------------|----------------|------------|---|-------------|----------------|------------|-------------|
|                          | PV (n=39)                              | TE (n=61)  | OR (IC 95%)    | Valor de p | <i>JAK2V617F</i> + (n=45) | <i>JAK2V617F</i> - (n=48) | OR (IC 95%)    | Valor de p | ≥50% (n=20)   | <50% (n=25) | OR (IC 95%)    | Valor de p |             |
| <b>rs6476933</b>         |  |            |                |            |                           |                           |                |            |   |             |                |            |             |
| CC                       | 27 (69,2)                              | 31 (50,8)  | 0,3 (0,1-0,8)  | 0,035      | 32 (71,1)                 | 23 (47,9)                 | 0,5 (0,2-0,9)  | 0,052      | 17 (85,0)   | 15 (60,0)   | 0,1 (0,01-0,9) | 0,053      | CT vs CC    |
| CT                       | 6 (15,4)                               | 21 (34,4)  | 0,4 (0,2-1,1)  | 0,096      | 8 (17,8)                  | 17 (35,4)                 | 0,3 (0,1-0,8)  | 0,034      | 1 (5,0)   | 7 (28,0)    | 0,2 (0,07-1,0) | 0,099      | CT/TT vs CC |
| TT                       | 6 (15,4)                               | 9 (14,8)   | 0,7 (0,2-2,5)  | 0,774      | 5 (11,1)                  | 8 (16,7)                  | 0,4 (0,1-1,4)  | 0,229      | 2 (10,0)  | 3 (12,0)    | 0,5 (0,09-3,2) | 0,659      | TT vs CC    |
| C                        | 60 (76,9)                              | 83 (68,0)  | 0,6 (0,3-1,1)  | 0,200      | 72 (80,0)                 | 63 (65,6)                 | 0,7 (0,4-1,3)  | 0,357      | 35 (87,5)   | 37 (74,0)   | 0,4 (0,1-1,2)  | 0,183      | T vs C      |
| T                        | 18 (23,1)                              | 39 (32,0)  |                |            | 18 (20,0)                 | 33 (34,4)                 |                |            | 5 (12,5)  | 13 (26,0)   |                |            |             |
| <b>rs189703877</b>       |  |            |                |            |                           |                           |                |            |   |             |                |            |             |
| AA                       | 36 (92,3)                              | 52 (85,2)  | 0,7 (0,1-2,7)  | 0,736      | 41 (91,1)                 | 42 (87,7)                 | 1,0 (0,2-3,7)  | >0,999     | 20 (100)  | 21 (84,0)   | -              | -          | AC vs AA    |
| AC                       | 3 (7,7)                                | 6 (9,8)    | 0,4 (0,1-1,6)  | 0,357      | 4 (8,9)                   | 4 (8,3)                   | 0,6 (0,2-2,4)  | 0,741      | 0   | 5 (20,0)    | -              | -          | AC/CC vs AA |
| CC                       | 0                                      | 3 (4,9)    | -              | -          | 0                         | 2 (4,2)                   | -              | -          | 0   | 0           | -              | -          | -           |
| A                        | 75 (96,2)                              | 110 (90,2) | 0,3 (0,1-1,3)  | 0,174      | 86 (95,6)                 | 88 (91,7)                 | 0,5 (0,1-1,6)  | 0,374      | 40  | 47 (94,0)   | -              | -          | C vs A      |
| C                        | 3 (3,8)                                | 12 (9,8)   |                |            | 4 (4,4)                   | 8 (8,3)                   |                |            | 0   | 5 (10,0)    |                |            |             |
| <b>rs73389454</b>        |  |            |                |            |                           |                           |                |            |   |             |                |            |             |
| AA                       | 36 (92,3)                              | 52 (85,2)  | 0,7 (0,1-2,7)  | 0,736      | 41 (91,1)                 | 42 (87,7)                 | 1,0 (0,2-3,7)  | >0,999     | 20 (100)  | 21 (84,0)   | -              | -          | AC vs AA    |
| AC                       | 3 (7,7)                                | 6 (9,8)    | 0,4 (0,1-1,6)  | 0,357      | 4 (8,9)                   | 4 (8,3)                   | 0,6 (0,2-2,4)  | 0,741      | 0   | 5 (20,0)    | -              | -          | AC/CC vs AA |
| CC                       | 0                                      | 3 (4,9)    | -              | -          | 0                         | 2 (4,2)                   | -              | -          | 0   | 0           | -              | -          | -           |
| A                        | 75 (96,2)                              | 110 (90,2) | 0,3 (0,1-1,3)  | 0,174      | 86 (95,6)                 | 88 (91,7)                 | 0,5 (0,1-1,6)  | 0,374      | 40  | 47 (94,0)   | -              | -          | C vs A      |
| C                        | 3 (3,8)                                | 12 (9,8)   |                |            | 4 (4,4)                   | 8 (8,3)                   |                |            | 0   | 5 (10,0)    |                |            |             |
| <b>rs1887428</b>         |  |            |                |            |                           |                           |                |            |   |             |                |            |             |
| GG                       | 18 (46,2)                              | 18 (29,5)  | 0,4 (0,1-1,14) | 0,148      | 24 (53,3)                 | 12 (25,0)                 | 0,4 (0,1-1,1)  | 0,093      | 15 (75,0)   | 9 (36,0)    | 0,1 (0,04-0,9) | 0,052      | GC vs GG    |
| GC                       | 11 (28,2)                              | 24 (39,3)  | 0,4 (0,2-1,1)  | 0,134      | 15 (33,3)                 | 17 (35,4)                 | 0,2 (0,1-0,6)  | 0,006      | 2 (10,0)  | 13 (52,0)   | 0,1 (0,05-0,7) | 0,015      | GC/CC vs GG |
| CC                       | 10 (25,6)                              | 19 (31,1)  | 0,5 (0,1-1,4)  | 0,313      | 6 (13,3)                  | 19 (39,6)                 | 0,1 (0,05-0,4) | 0,001      | 3 (15,0)  | 3 (12,0)    | 0,6 (0,1-3,0)  | 0,659      | CC vs GG    |
| G                        | 47 (60,3)                              | 60 (49,2)  | 0,3 (0,09-1,1) | 0,096      | 63 (70,0)                 | 41 (42,7)                 | 0,3 (0,1-0,5)  | 0,0002     | 32 (80,0)   | 31 (62,0)   | 0,4 (0,1-1,1)  | 0,070      | G vs C      |
| C                        | 31 (39,7)                              | 62 (50,8)  |                |            | 27 (30,0)                 | 55 (57,3)                 |                |            | 8 (20,0)  | 19 (38,0)   |                |            |             |
| <b>rs1887429</b>         |  |            |                |            |                           |                           |                |            |   |             |                |            |             |
| GG                       | 25 (64,1)                              | 27 (44,3)  | 0,2 (0,07-0,5) | 0,002      | 31 (68,9)                 | 19 (39,6)                 | 0,2 (0,08-0,6) | 0,004      | 17 (85,0)   | 14 (56,0)   | -              | -          | GT vs GG    |
| GT                       | 5 (12,8)                               | 27 (44,3)  | 0,4 (0,1-1,0)  | 0,065      | 8 (17,8)                  | 21 (43,8)                 | 0,2 (0,1-0,6)  | 0,006      | 0   | 8 (32,0)    | 0,2 (0,05-0,9) | 0,053      | GT/TT vs GG |
| TT                       | 9 (23,1)                               | 7 (11,5)   | 1,3 (0,4-4,0)  | 0,775      | 6 (13,3)                  | 8 (16,7)                  | 0,4 (0,1-1,4)  | 0,232      | 3 (15,0)  | 3 (12,0)    | 0,8 (0,1-3,9)  | >0,999     | TT vs GG    |
| G                        | 55 (70,5)                              | 81 (66,4)  | 0,8 (0,4-1,5)  | 0,641      | 70 (77,8)                 | 59 (61,5)                 | 0,4 (0,2-0,8)  | 0,014      | 34 (85,0)   | 36 (72,0)   | 0,4 (0,1-1,3)  | 0,202      | T vs G      |
| T                        | 23 (29,5)                              | 41 (33,6)  |                |            | 20 (22,2)                 | 37 (38,5)                 |                |            | 6 (15,0)  | 14 (28,0)   |                |            |             |

Legenda: PV: policitemia vera, TE: trombocitemia essencial, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confiança



### **Associação com o haplótipo 46/1 (*rs10974944*)**

A distribuição das variantes em relação ao status de *rs10974944* (C>G) estão demonstrados na tabela 2. Para *rs6476933* (C>T), o genótipo CT apresentou frequência similar entre os grupos positivo e negativo (25,4% vs. 29,7%, respectivamente; OR = 0,6; IC 95%: 0,2-1,6; p = 0,328), assim como o genótipo TT (9,5% vs. 24,3%, respectivamente; OR = 0,2; IC 95%: 0,07-0,9; p = 0,036). O alelo T foi mais prevalente nos indivíduos com status negativo (39,2% vs. 22,2%, respectivamente).

Para *rs189703877* (A>C), o genótipo CC foi mais frequente em indivíduos com o status positivo em relação ao negativo (7,6% vs. 2,7%, respectivamente; OR = 3,4; IC 95%: 0,4-41,7; p = 0,397), assim como o alelo C (12,7% vs. 2,7%, respectivamente).

Em relação a *rs73389454* (A>C), o genótipo AC mostrou uma frequência similar entre os grupos positivo e negativo (7,9% vs. 10,8%, respectivamente; OR = 0,3; IC 95%: 0,1-1,2; p = 0,124). Não foram observados indivíduos com o genótipo CC no grupo positivo. O alelo C foi mais frequente nos indivíduos com status negativo (13,5%).

O genótipo selvagem (GG) de *rs1887428* foi mais prevalente nos indivíduos com 46/1+ (49,2% vs. 13,5%, respectivamente), enquanto o genótipo variante (CC) foi mais frequente nos indivíduos 46/1- (62,2 vs. 9,5%, respectivamente). Essas diferenças foram estatisticamente significativas, com um OR de 0,04 (IC 95%: 0,01-0,1; p = <0,0001) para GC vs GG e um OR de 0,1 (IC 95%: 0,06-0,4; p = 0,0005) p = <0,0001).

Em relação a *rs1887429*, os genótipos GT e TT apresentaram frequências diferentes entre os grupos (OR: 0,4; IC 95%: 0,1-0,9; p = 0,038 e OR: 0,2; IC 95%: 0,06-0,7; p = 0,015) e o alelo G foi mais prevalente nos indivíduos 46/1+ (75,4% vs. 55,4%, respectivamente; OR = 0,4; IC 95%: 0,2-0,7; p = 0,004), enquanto o alelo T foi mais comum nos 46/1- (24,6% vs. 44,6%, respectivamente).

### **Associação com *rs10815151* (C>T)**

A distribuição das variantes em relação ao status de *rs10815151* (C>T) estão demonstrados na tabela 2. O SNV *rs6476933* (C>T) apresentou os genótipos CT (42,9%) e TT (28,6%) mais frequentes nos indivíduos *rs10815151*+. Essas diferenças foram estatisticamente significativas, com ORs de 7,6 (IC 95%: 2,7-22,1; p < 0,0001) para CT vs. CC, 9,5 (IC 95%: 3,8-22,2; p < 0,0001) para CT/TT vs. CC e 15,3 (IC 95%: 3,5-54,4; p = <0,0001) para TT vs. CC. O alelo T foi mais prevalente nos indivíduos com *rs10815151*+ (50%).

**Tabela 2:** distribuição alélica e genotípica de SNVs do promotor de acordo com NMP, status de 46/1 e *rs10815151* (C>T)

| Genótipo ou alelo, n (%) | Haplótipo 46/1 ( <i>rs10974944</i> :G) |                 |                        |                   | Variante do íntron 12 ( <i>rs10815151</i> : T) |                    |                        |                   |             |
|--------------------------|--|-----------------|------------------------|-------------------|--|--------------------|------------------------|-------------------|-------------|
|                          | 46/1+<br>(n=63)                        | 46/1-<br>(n=37) | OR<br>(IC 95%)         | Valor de p        | Positivo<br>(n=42)                             | Negativo<br>(n=58) | OR<br>(IC 95%)         | Valor de p        |             |
| <i>rs6476933</i>         |  |                 |                        |                   |  |                    |                        |                   |             |
| CC                       | 41 (65,1)                              | 17 (45,9)       | 0,6 (0,2-1,6)          | 0,328             | 12 (28,6)                                      | 46 (79,3)          | <b>7,6 (2,7-22,1)</b>  | <b>&lt;0,0001</b> | CT vs CC    |
| CT                       | 16 (25,4)                              | 11 (29,7)       | 0,4 (0,1-1,0)          | 0,092             | 18 (42,9)                                      | 9 (15,5)           | <b>9,5 (3,8-22,2)</b>  | <b>&lt;0,0001</b> | CT/TT vs CC |
| TT                       | 6 (9,5)                                | 9 (24,3)        | <b>0,2 (0,07-0,9)</b>  | <b>0,036</b>      | 12 (28,6)                                      | 3 (5,2)            | <b>15,3 (3,5-54,5)</b> | <b>&lt;0,0001</b> | TT vs CC    |
| C                        | 98 (77,8)                              | 45 (60,8)       | <b>0,4 (0,2-0,8)</b>   | <b>0,014</b>      | 42 (50,0)                                      | 101 (87,1)         | <b>6,7 (3,3-13,8)</b>  | <b>&lt;0,0001</b> | T vs C      |
| T                        | 28 (22,2)                              | 29 (39,2)       |                        |                   | 42 (50,0)                                      | 15 (12,9)          |                        |                   |             |
| <i>rs189703877</i>       |  |                 |                        |                   |  |                    |                        |                   |             |
| AA                       | 52 (82,5)                              | 36 (97,3)       | -                      | -                 | 38 (90,5)                                      | 50 (86,2)          | 1,3 (0,2-5,8)          | >0,999            | AC vs AA    |
| AC                       | 6 (9,5)                                | 0               | 7,6 (1,2-84,2)         | 0,029             | 3 (7,1)  | 3 (5,2)            | 0,6 (0,2-2,1)          | 0,756             | AC/CC vs AA |
| CC                       | 5 (7,6)                                | 1 (2,7)         | 3,4 (0,4-41,7)         | 0,397             | 1 (2,4)  | 5 (8,6)            | 0,2 (0,0-2,1)          | 0,395             | CC vs AA    |
| A                        | 110 (87,3)                             | 72 (97,3)       | 5,2 (1,3-23,4)         | 0,019             | 79 (94,0)                                      | 103 (88,8)         | 0,5 (0,1-1,4)          | 0,222             | C vs A      |
| C                        | 16 (12,7)                              | 2 (2,7)         |                        |                   | 5 (6,0)  | 13 (11,2)          |                        |                   |             |
| <i>rs73389454</i>        |  |                 |                        |                   |  |                    |                        |                   |             |
| AA                       | 58 (92,1)                              | 30 (81,1)       | 0,6 (0,1-2,2)          | 0,715             | 34 (81,0)                                      | 54 (93,1)          | 1,9 (0,5-6,7)          | 0,477             | AC vs AA    |
| AC                       | 5 (7,9)                                | 4 (10,8)        | 0,3 (0,1-1,2)          | 0,124             | 5 (11,9)                                       | 4 (6,9)            | 3,1 (0,9-9,9)          | 0,116             | AC/CC vs AA |
| CC                       | 0                                      | 3 (8,1)         | -                      | -                 | 3 (7,1)  | 0                  | -                      | -                 | -           |
| A                        | 121 (96,0)                             | 64 (86,5)       | <b>0,2 (0,09-0,7)</b>  | <b>0,023</b>      | 73 (86,9)                                      | 112 (96,6)         | <b>4,2 (1,4-12,3)</b>  | <b>0,013</b>      | C vs A      |
| C                        | 5 (4,0)                                | 10 (13,5)       |                        |                   | 11 (13,1)                                      | 4 (3,4)            |                        |                   |             |
| <i>rs1887428</i>         |  |                 |                        |                   |  |                    |                        |                   |             |
| GG                       | 31 (49,2)                              | 5 (13,5)        | 0,4 (0,1-1,6)          | 0,245             | 7 (16,7)                                       | 29 (50,0)          | <b>3,4 (1,1-9,2)</b>   | 0,023             | GC vs GG    |
| GC                       | 26 (41,3)                              | 9 (24,3)        | <b>0,1 (0,06-0,4)</b>  | <b>0,0005</b>     | 16 (38,1)                                      | 19 (32,8)          | <b>5,0 (1,9-12,3)</b>  | <b>0,0007</b>     | GC/CC vs GG |
| CC                       | 6 (9,5)                                | 23 (62,2)       | <b>0,04 (0,01-0,1)</b> | <b>&lt;0,0001</b> | 19 (45,2)                                      | 10 (17,2)          | <b>7,8 (2,4-24,0)</b>  | <b>0,0003</b>     | CC vs GG    |
| G                        | 88 (69,8)                              | 19 (25,7)       | <b>0,1 (0,07-0,2)</b>  | <b>&lt;0,0001</b> | 30 (35,7)                                      | 77 (66,4)          | <b>3,5 (1,9-6,2)</b>   | <b>&lt;0,0001</b> | G vs C      |
| C                        | 38 (30,2)                              | 55 (74,3)       |                        |                   | 54 (64,3)                                      | 39 (33,6)          |                        |                   |             |
| <i>rs1887429</i>         |  |                 |                        |                   |  |                    |                        |                   |             |
| GG                       | 38 (60,3)                              | 14 (37,8)       | 0,5 (0,2-1,3)          | 0,232             | 8 (19,0)                                       | 44 (75,9)          | <b>14,0 (4,7-38,4)</b> | <b>&lt;0,0001</b> | GT vs GG    |
| GT                       | 19 (30,2)                              | 13 (35,1)       | <b>0,4 (0,1-0,9)</b>   | <b>0,038</b>      | 23 (54,8)                                      | 9 (15,5)           | <b>13,3 (4,9-36,9)</b> | <b>&lt;0,0001</b> | GT/TT vs GG |
| TT                       | 6 (9,5)                                | 10 (27,0)       | <b>0,2 (0,06-0,7)</b>  | <b>0,015</b>      | 11 (26,2)                                      | 5 (8,6)            | <b>12,1 (3,0-43,1)</b> | <b>0,0001</b>     | TT vs GG    |
| G                        | 95 (75,4)                              | 41 (55,4)       | <b>0,4 (0,2-0,7)</b>   | <b>0,004</b>      | 39 (46,4)                                      | 97 (83,6)          | <b>5,8 (2,9-11,3)</b>  | <b>&lt;0,0001</b> | T vs G      |
| T                        | 31 (24,6)                              | 33 (44,6)       |                        |                   | 45 (53,6)                                      | 19 (16,4)          |                        |                   |             |

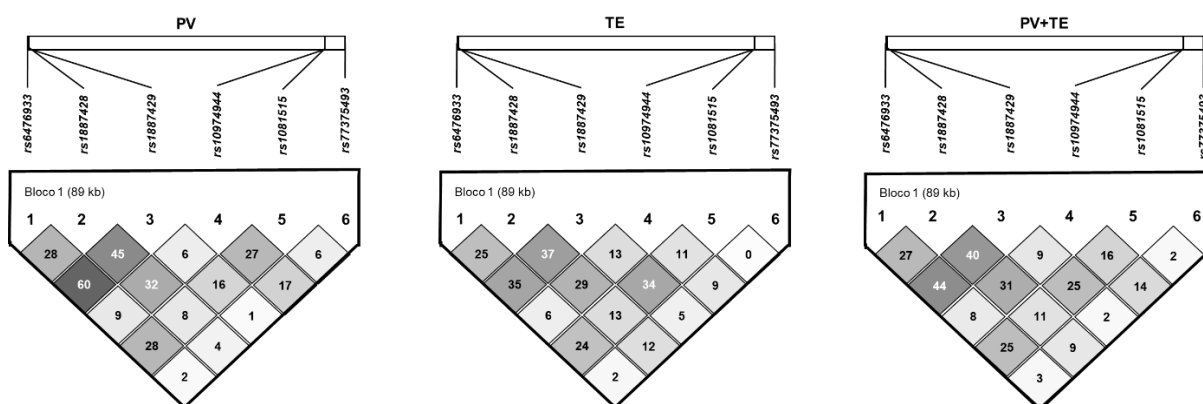
*rs189703877* (A>C) apresentou frequências semelhantes no que tangem aos genótipos e alelos variantes, sem diferenças significativas na distribuição genotípica entre os grupos. Já *rs73389454* (A>C) não apresentou *rs108151516-* para o genótipo CC.

Para a alteração genética *rs1887428* (C>G), o genótipo CC foi mais frequente nos indivíduos com *rs108151516-* (45,2%; CC vs GG: OR: 3,4, IC 95%: 1,1-9,2;  $p = 0,003$ ). Em relação aos alelos, o alelo G foi mais comum nos indivíduos com *rs108151516+* (33,6% vs. 64,3%; OR = 3,5; IC 95%: 1,9-6,2;  $p = <0,0001$ ).

Os genótipos variantes de *rs1887429* (G>T) apresentaram frequências diferentes entre os grupos *rs108151516+* e *rs108151516-*, ou seja, GT (54,8% vs. 15,5%, respectivamente) e TT (26,2% vs. 8,6%, respectivamente). Essas diferenças foram estatisticamente significativas, com ORs de 13,3 (IC 95%: 4,9-36,9;  $p < 0,0001$ ) para GT/TT vs. GG e 12,1 (IC 95%: 3,0-43,1;  $p = 0,0001$ ) para TT vs GG. O alelo T foi mais comum nos indivíduos *rs108151516-* (53,6% vs. 16,4%).

### Haplótipos identificados

Os haplótipos identificados estão demonstrados na figura 1 e seus dados estão descritos na tabela 3. O haplótipo 2, representado pelas variantes genéticas *rs6476933C/rs1887428G/rs1887429G/rs10974944G/rs10815151C/rs77375493T*, apresentou frequência de 25,6% em PV e 9,8% em TE, com associação estatisticamente significativa ( $p = 0,002$ ). O *odds ratio* de 3,1 (IC 95%: 1,0-9,8) sugere uma maior probabilidade de ocorrência de PV em indivíduos com esse haplótipo em comparação com os outros. Os outros haplótipos não demonstraram associações significativas com as condições estudadas.



**Figura 1:** Estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) de variantes do promotor, íntron 12 e éxon 14 de *JAK2* em pacientes com policitemia vera (PV) e trombocitemia essencial (TE). Valores nas caixas indicam o valor do coeficiente de correlação de LD ( $r^2$ ) multiplicado por 100. As tendências da caixa em direção ao branco indicam valor de  $r^2$  diminuído, LD forte representado pela caixa cinza-escuro. Devido à baixa frequência nas NMPS, *rs189703877* (A>C) e *rs73389454* (A>C) não foram considerados para a análise. Um moderado DL é observado entre *rs647933* e *rs1887429*, sendo mais preponderante em PV; e *rs1887428* (G>C) e *rs1887429* (G>T). Não foram observados desequilíbrio de ligação forte ou moderado entre variantes do promotor e variantes do íntron 12 (*rs10974944* e *rs10815151*) ou éxon 14 (*rs77375493*/*JAK2V617F*).

**Tabela 3:** haplótipos do promotor e íntron 12 do gene *JAK2* presente em indivíduos com policitemia vera e trombocitemia essencial

| Haplótipo | <i>rs647933</i> | <i>rs1887428</i> | <i>rs1887429</i> | <i>rs10974944</i> | <i>rs10815151</i> | <i>rs77375493</i> | PV*        | TE*        | Qui-quadrado | Odds ratio           | valor de p   |
|-----------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|------------|--------------|----------------------|--------------|
| 1         | C               | G                | G                | G                 | C                 | G                 | 6 (15,4%)  | 12 (19,6%) | 0,732        | 0,7 (0,2-2,2)        | 0,393        |
| 2         | C               | G                | G                | G                 | C                 | T                 | 10 (25,6%) | 6 (9,8%)   | <b>9,509</b> | <b>3,1 (1,0-9,8)</b> | <b>0,002</b> |
| 3         | T               | C                | T                | C                 | T                 | G                 | 4 (10,2%)  | 9 (14,7%)  | 0,739        | 0,6 (0,2-2,4)        | 0,389        |
| 4         | C               | C                | G                | C                 | C                 | G                 | 4 (10,2%)  | 7 (11,4%)  | 0,235        | 0,8 (0,2-3,1)        | 0,627        |
| 5         | C               | G                | G                | C                 | C                 | G                 | 2 (5,1%)   | 6 (9,8%)   | 1,423        | 0,4 (0,09-2,1)       | 0,232        |
| 6         | C               | C                | T                | C                 | C                 | G                 | 1 (2,5%)   | 2 (3,2%)   | 0,001        | 2,8 (0,3-41,7)       | 0,975        |

Legenda: PV: policitemia vera, TE: trombocitemia essencial.

\*São demonstrados na tabela apenas os haplótipos com frequência maior ou igual a 2%.

## DISCUSSÃO

O estudo da região promotora em genes envolvidos nas neoplasias mieloproliferativas ainda é algo incipiente, em especial sobre qual seu o papel dentro do complexo cenário etiopatogênico dessas doenças. Mesmo que seja bem estabelecido que variantes condutoras em regiões codificantes de *JAK2*, *MPL* e *CARL* possuam um papel protagonista no desencadeamento dessas malignidades hematológicas<sup>18,30</sup>, eventos biológicos adicionais, como alterações epigenéticas do tipo metilação, possivelmente contribuem para o início e progressão das NMPs<sup>15,28</sup>. Outros eventos ainda não tão compreendidos também podem estar envolvidos como alteração de fatores transcrição, como notado em outras neoplasias<sup>31-34</sup>.

Os achados do presente estudo dão *insights* sobre a necessidade de novas abordagens de investigação para a compreensão mais completa do cenário molecular das neoplasias mieloproliferativas, já que variantes em promotores de genes podem alterar a ligação do fator de transcrição e a atividade do promotor<sup>35</sup>.

Das cinco variantes identificadas, *rs189703877* (A>C), *rs73389454* (A>C), *rs1887428* (G>C) e *rs1887429* (G>T) estão localizadas dentro de ilhas CpG, um conjunto de sequências de DNA alternadas diferente do padrão genômico médio devido à alta concentração de GC, ricas em CpG e predominantemente não metiladas<sup>36</sup>. A hipermetilação de ilhas CpG já foi

descrita em NMPs<sup>37</sup>, todavia, nossos dados não sustentam possíveis relações entre status de metilação do promotor e outros achados moleculares das NMPs identificados.

Variantes localizadas no promotor gênico podem influenciar a ligação de fatores de transcrição específicos, condicionar um recrutamento diferenciado de cofatores e exercer papel na metilação do DNA, resultando em expressão gênica diferencial entre o alelo selvagem e o variante<sup>38</sup>. Os SNVs *rs6476933* (C>T) e *rs1887429* (G>T) estão localizados em sítios de ligação de fatores de transcrição<sup>39</sup>, entretanto, informações específicas sobre suas interações gênicas e os seus impactos ainda são não são conhecidos. Isso evidencia a necessidade de mais estudos funcionais, com maiores populações a fim de verificar a existência de intensificadores ou repressores transcricionais envolvidos e as possíveis associações com outros genes associados a alterações epigenéticas nas NMPs, como *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* e *EZH2*<sup>40</sup>.

De todas as variantes, *rs1887428* (G>C) apresentou o comportamento interessante no âmbito das associações realizadas. O alelo selvagem de *rs1887428* (G) é considerando uma variante de risco para doença inflamatória intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico, doença de Chron, colite ulcerativa e colangite esclerosante primária<sup>27,41</sup>. Na DII, o alelo de risco (G) de *rs1887428* está vinculado ao fator de transcrição RBPJ (*Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin Kappa J Region*), enquanto o alelo protetor está vinculado ao fator de transcrição (*Cut-like homeobox 1*). A ligação ao alelo variante a RBPJ resultam em um efeito regulador *cis* muito modesto, mas acompanhado por um efeito *trans* significativo em *STAT5B* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5B*)<sup>27</sup>.

Nas NMPs, associações similares envolvendo fatores de transcrição foram descritas, mais especificamente com c-Fos/c-Jun (Proteína ativadora 1), um heterodímero proteico que age sobre transdução de sinal intracelular, mediando processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência celular<sup>42</sup>. Um estudo demonstrou que o alelo G de *rs1887428* tem maior afinidade com o complexo c-Fos/c-Jun, o que leva a uma modulação positiva da diferenciação hematopoiética resultante expressão aumentada de *JAK2*<sup>43</sup>. Nesse contexto, o alelo C possui um papel protetor, agindo de forma antagônica a esse processo.

Essa percepção vai de encontro com os nossos achados. O alelo de risco (G) da variante *rs1887428* foi associado a *JAK2V617F*+ VAF $\geq$ 50% e presença do haplótipo 46/1 (*rs10974944*). Isso nos leva a hipotetizar sobre uma possível correlação dessas alterações genéticas dentro do cenário molecular das NMPs, onde a variante do promotor aumenta a expressão do gene *JAK2* mutado com *JAK2V617F*. Em contrapartida, o haplótipo 46/1 favorece a expansão clonal dessas células, o que garante uma vantagem proliferativa, favorece o distúrbio mieloproliferativo clonal, além de elevar a frequência alélica variante, pontos

similares ao que já foi reportado anteriormente<sup>44,45</sup>. A relação do alelo C e genótipo CC de *rs1887428* com *rs10815151*, associada a proteção contra *JAK2V617F* (dados não publicados), demonstra o possível papel regulador dessa variante nas NMPs. Todavia, mais estudos são necessários para o melhor entendimento dessas premissas previamente estabelecidas.

Um dos haplótipos identificados em nosso estudo (*rs647933C/rs73389454A/rs1887428G/rs1887429G/rs10974944G/rs10815151C/rs77375493T*), foi associado ao desenvolvimento de PV, neoplasia onde a sinalização de JAK2 é mais evidente<sup>46</sup> e a relação com *JAK2V617F* é bem estabelecida<sup>47</sup>, pontos que corroboram sobre a relação entre as variantes anteriormente descritas e seus possível papéis nas NMPs. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar essa relação.

Os resultados desses estudos mostram que os alelos de *rs1887428* possuem diferentes associações, onde o alelo de risco (G) está associado a *JAK2V617F+ VAF≥50%*, ao passo que o alelo variante (C) tem relação inversa. *rs6476933* (C>T) e *rs1887429* (G>T) criam sítios de fatores de transcrição, mas com proteínas relacionadas até o momento desconhecidas, o que demonstra necessidade de estudos funcionais para verificar o papel dessas variantes.

Os estudos realizados na presente pesquisa fornecem novos dados para se entender o papel do promotor nas NMPs. Estudos adicionais com amostras maiores e populações diversas podem fornecer *insights* sobre os mecanismos moleculares subjacentes às doenças e identificar possíveis alvos terapêuticos para intervenção das neoplasias mieloproliferativas.

## Referências

1. Swerdlow, S. H. *et al.* *World Health Organization Classification of Tumours This book and all other volumes of the series can be purchased : From all countries. World Health Organization* (2017).
2. Khoury, J. D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* (2022) doi:10.1038/s41375-022-01613-1.
3. Gai, V., Secreto, C., Freilone, R. & Pregno, P. Philadelphia-negative MPN: A molecular journey, from hematopoietic stem cell to clinical features. *Medicina (Lithuania)* vol. 57 (2021).
4. Zerbini, M. C. N. *et al.* Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: Padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **47**, 643–648 (2011).
5. Torres, D. G. *et al.* JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Biomolecules* vol. 12 1–18 (2022).
6. Langabeer, S. E. *et al.* Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. *Eur. J. Haematol.* **95**, 270–279 (2015).
7. Scott, L. M. *et al.* JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 459–468 (2007).
8. Grinfeld, J., Nangalia, J. & Green, A. R. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **102**, 7–17 (2017).
9. Hirvonen, E. A. M., Pitkänen, E., Hemminki, K., Aaltonen, L. A. & Kilpivaara, O. Whole-exome sequencing identifies novel candidate predisposition genes for familial polycythemia vera. *Hum. Genomics* **11**, 1–6 (2017).
10. Zuo, Z. *et al.* Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms: Laboratory Workup in the Era of Next-Generation Sequencing. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **14**, 376–385 (2019).

11. Viny, A. D. & Levine, R. L. Genetics of myeloproliferative neoplasms. *Cancer J. (United States)* **20**, 61–65 (2014).
12. Vainchenker, W. & Kralovics, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* **129**, 667–679 (2017).
13. Moliterno, A. R. & Kaizer, H. Applied genomics in MPN presentation. *Hematol. (United States)* **20**, 434–439 (2020).
14. Alshemmari, S. H., Rajan, R. & Emadi, A. Molecular Pathogenesis and Clinical Significance of Driver Mutations in Primary Myelofibrosis: A Review. *Med. Princ. Pract.* **25**, 501–509 (2016).
15. Mascarenhas, J., Roper, N., Chaurasia, P. & Hoffman, R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. *Clin Epigenetic* **2**, 197–212 (2011).
16. Szybinski, J. & Meyer, S. C. Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **35**, 217–236 (2021).
17. Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G. & Albano, F. The JAK2 GGCC 46/1 haplotype in myeloproliferative neoplasms: Causal or random? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–12 (2018).
18. Jang, M. A. & Choi, C. W. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean J. Intern. Med.* **35**, 1–11 (2020).
19. Landgren, O. *et al.* 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* **112**, 2199–2204 (2008).
20. Jones, A. V. & Cross, N. C. P. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther. Adv. Hematol.* **4**, 237–253 (2013).
21. Tashi, T., Swierczek, S. & Prchal, J. T. Familial MPN Predisposition. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **12**, 442–447 (2017).
22. Olcaydu, D. *et al.* The role of the JAK2 GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **96**, 367–374 (2011).
23. Ohyashiki, J. H. *et al.* The C allele of JAK2 rs4495487 is an additional candidate locus that contributes to myeloproliferative neoplasm predisposition in the Japanese population. *BMC Med. Genet.* **13**, 6 (2012).
24. Liggett, L. A. & G., S. V. Unraveling Hematopoiesis Through the Lens of Genomics L. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
25. Hubner, R. A. & Houlston, R. S. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Mol. Basis Hum. Cancer* **8**, 231–239 (2016).
26. Oddsson, A. *et al.* The germline sequence variant rs2736100-C in TERT associates with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* vol. 28 1371–1374 (2014).
27. Cardinale, C. J. *et al.* Regulation of Janus Kinase 2 by an Inflammatory Bowel Disease Causal Non-coding Single Nucleotide Polymorphism. 1–8 (2020) doi:10.1093/ecco-jcc/jjz213.
28. Hautin, M., Bernard, D. G., Corcos, L. & Lippert, E. Splicing Anomalies in Myeloproliferative Neoplasms : Paving the Way for New Therapeutic Venues. 1–22 (2020).
29. L. Phan, Y. Jin, H. Zhang, W. Qiang, E. Shekhtman, D. Shao, D. Revoe, R. Villamarin, E. Ivanchenko, M. Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, J. B. Holmes, V. Lyoshin, K. Kaur, E. Mo, and B. L. K. ALFA: Allele Frequency Aggregator. *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine* (2020).
30. Bochicchio, M. T. *et al.* Understanding Aberrant Signaling to Elude Therapy Escape Mechanisms in Myeloproliferative Neoplasms. (2022) doi:10.3390/cancers14040972.
31. Kadlubar, F. F. & Lin, D. and Their Association With Risk of Esophageal Cancer. *Gastroenterology* **129**, 565–576 (2005).
32. Hau, P. *et al.* Identification of a Functional Variant in the MICA Promoter Which Regulates MICA Expression and Increases HCV-Related Hepatocellular Carcinoma Risk. *PLoS One* **8**, (2013).
33. Shin, Y. *et al.* A functional polymorphism ( À 347 G ! GA ) in the E-cadherin gene is associated with colorectal cancer. *Carcinogenesis* **25**, 2173–2176 (2004).
34. Li, L. *et al.* Advances in Brief A Single Nucleotide Polymorphism in the E-cadherin Gene Promoter Alters Transcriptional Activities 1. *Cancer re* **60**, 873–876 (2000).
35. Soderquest, K. *et al.* Genetic variants alter T-bet binding and gene expression in mucosal inflammatory disease. (2017) doi:10.1371/journal.pgen.1006587.
36. Deaton, M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010–1022 (2011).
37. Bennemann, K. *et al.* Epigenetic dysregulation of secreted frizzled-related proteins in myeloproliferative neoplasms complements the. *Clin Epigenetic* 1–7 (2012).

38. Tseng, C. *et al.* Genetic Variants in Transcription Factor Binding Sites in Humans : Triggered by Natural Selection and Triggers of Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–22 (2021).
39. Zhou, F., Cheng, L., Qiu, L., Wang, M. & Li, J. Associations of potentially functional variants in IL-6 , JAKs and STAT3 with gastric cancer risk in an eastern Chinese population. *Oncotarget* **7**, (2015).
40. Garieri, M. *et al.* The effect of genetic variation on promoter usage and enhancer activity. *Nat. Commun.* **8**, 1–7 (2017).
41. Morris, D. L. *et al.* Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus. (2016) doi:10.1038/ng.3603.
42. Tsiambas, E. *et al.* c-Jun / c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma. *Jbuon* **25**, 618–620 (2020).
43. Schram, A. M. *et al.* Genetic and Functional Investigation of Germline JAK2 Alleles That Predispose to Myeloproliferative Neoplasms. *Blood* **118**, 124–124 (2011).
44. Trifa, A. P. *et al.* The G allele of the JAK2 *rs10974944* SNP, part of JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Ann. Hematol.* **89**, 979–983 (2010).
45. Paes, J., Silva, G. A. V., Tarragô, A. M. & Mourão, L. P. d. S. The Contribution of JAK2 46/1 Haplotype in the Predisposition to Myeloproliferative Neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 20 (2022).
46. Rampal, R. *et al.* Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* **123**, 1–3 (2014).
47. Stuckey, R. & Gómez-Casares, M. T. Recent advances in the use of molecular analyses to inform the diagnosis and prognosis of patients with polycythaemia vera. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).



## 6. CONCLUSÕES

Sobre o íntron 12, os resultados do presente estudo mostram que a variante *rs10974944* (C>G) está associado a neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas, positivas para *JAK2V617F*, em especial PV, elevada carga alélica variante desses pacientes e alterações hematológicas na população estudada. Já a variante *rs10815151* demonstrou comportamento antagônico à *JAK2V617F* e VAF, sendo necessário outros estudos para verificar essa possível relação.

Já em sobre o promotor gênico, o alelo G de *rs1887428* demonstrou associação significativa com *JAK2V617F*+ VAF $\geq$ 50%, ao passo que o alelo variante (C) tem relação inversa. *rs6476933* (C>T) e *rs1887429* (G>T) criam sítios de fatores de transcrição, mas com proteínas relacionadas até o momento desconhecidas, o que demonstra necessidade de estudos funcionais para verificar o papel dessas variantes. Esses resultados sugerem que as variantes no promotor do gene JAK2 podem desempenhar um papel no desenvolvimento e progressão das NMPs.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Pagliarini-e-Silva S. Estudo da frequência dos haplótipos do gene JAK2 em pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas crônicas. Universidade Estadual de Maringá,; 2011.
2. Journal B, Freitas RM De, Magno C. Myeloproliferative neoplasms and the JAK / STAT signaling pathway: an overview. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. 2015;37(5):348–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.10.001>
3. Zerbini MCN, Soares FA, Morais JC, Vassallo J, Pereira Velloso EDR, De Lourdes L. F. Chauffaille M, et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: Padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4 a edição. J Bras Patol e Med Lab. 2011;47(6):643–8.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours This book and all other volumes of the series can be purchased : From all countries. World Health Organization. 2017.
5. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Leukemia. 2022;(June).
6. Monte-Mór BCR, Costa FF. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30(3).
7. Sieza Y, Di Cmlilo I, Mazziotta L, Archuby M, Riva M, Orellano L. 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. XXiii Congr argenTino Hematol. 2018;22(2):151–6.
8. 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(3).
9. Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. Blood. 2006;108(1):346–52.
10. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. Blood. 2008;112(6):2190–8.
11. Abello V, Quintero G, Espinosa D, Solano MH, Casas CP, Saavedra D, et al. Descripción de las características clínicas de las neoplasias mieloproliferativas crónicas ( NMPC ) Description of the clinical characteristics of chronic myeloproliferative neoplasms ( MPNs ) First report of the colombian registry of MPNs. Acta Médica Colomb [Internet]. 2017;42(1):35–41. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=163151162007>
12. Nielsen C, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Kofoed KF, Birgens HS. *JAK2V617F* somatic mutation in the general population: Myeloproliferative neoplasm development and progression rate. Haematologica. 2014;99(9):1448–55.
13. Transformation M. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation Florian. Cells. 2019;1.
14. Meireles CFA. Doenças mieloproliferativas. Fundamentos em hematologia. Universidade do Porto; 2011.
15. Trifa AP, Cucuianu A, Popp RA. Development of a reliable PCR-RFLP assay for

- investigation of the *JAK2 rs10974944* SNP, Which might predispose to the acquisition of somatic mutation *JAK2V617F*. *Acta Haematol.* 2010;123(2):84–7.
16. Jones A V., Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. *JAK2* haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 2009;41(4):446–9.
  17. 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;19(4):1–12.
  18. Campbell PJ. Somatic and germline genetics at the *JAK2* locus. *Nat Methods.* 2009;41(4):385–6.
  19. Paes J, Silva GAV, Tarragô AM, Mourão LP d. S. The Contribution of *JAK2* 46/1 Haplotype in the Predisposition to Myeloproliferative Neoplasms. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences.* 2022. p. 20.
  20. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, et al. A germline *JAK2* SNP is associated with predisposition to the development of *JAK2V617F* -positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 2009;41(4):455–9.
  21. Sud A, Chattopadhyay S, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist J, Houlston RS, et al. Familial risks of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2018;132(9):973–6.
  22. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadottir EA, 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(6):2199–204.
  23. Schram AM, Xu X, Kilpivaara O, Mukherjee S, Viny AD, Guryanova O, et al. Genetic and Functional Investigation of Germline *JAK2* Alleles That Predispose to Myeloproliferative Neoplasms. *Blood.* 2011;118(21):124–124.
  24. Groarke EM, Young N s. Aging and Hematopoiesis Emma. *Physiol Behav.* 2016;176(1):100–106.
  25. Masselli E, Pozzi G, Carubbi C, Vitale M. The genetic makeup of myeloproliferative neoplasms: Role of germline variants in defining disease risk, phenotypic diversity and outcome. *Cells.* 2021;10(10).
  26. Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: Mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother Radiopharm.* 2002;17(4):405–26.
  27. Liggett LA, G. SV. Unraveling Hematopoiesis Through the Lens of Genomics L. *Physiol Behav.* 2017;176(12):139–48.
  28. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis Michael. *Naturwissenschaften.* 2012;52(8):173–80.
  29. Seita J, Weissman I. Published in final edited form as: Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip RevSyst BiolMed.* 2010;2(5):1–20.
  30. Paiva HH, Rego EM. Hematopoese - Regulação e Microambiente. *Acta Pediatr Esp [Internet].* 2008;66(7):327–9. Available from: <https://bibliotecadebiomedicina.blogspot.com/2019/02/livro-tratado-de-hematologia-zago-1-ed.html>
  31. Bao EL, Cheng AN, Sankaran VG. The genetics of human hematopoiesis and its disruption in disease. *EMBO Mol Med.* 2019;11(8):1–13.
  32. Dzierzak E, Bigas A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell [Internet].* 2018;22(5):639–51. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.015>
33. Harrison CN, Koschmieder S, Foltz L, Guglielmelli P, Flindt T, Koehler M, et al. The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: results from the international MPN Landmark survey. *Ann Hematol.* 2017;96(10):1653–65.
  34. Spivak J. Myeloproliferative neoplasms. *Diagnostic Histopathol.* 2017;27(9):373–9.
  35. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: Before and after Dameshek. *Leukemia.* 2008;22(1):3–13.
  36. Jimenez S. Neoplasias mieloproliferativas Myeloproliferative neoplasms. *Acta médica Colomb.* 2017;42(1):15–7.
  37. Schultz M. Rudolf Virchow. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(9):1479–81.
  38. Cooper B. The Origins of Bone Marrow as the Seedbed of Our Blood: From Antiquity to the Time of Osler. *Baylor Univ Med Cent Proc.* 2011;24(2):115–8.
  39. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Gangat N, Vaidya R, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: The Mayo Clinic experience. *Mayo Clin Proc [Internet].* 2012;87(1):25–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.11.001>
  40. Cuthbert D, Stein BL. Polycythemia vera-associated complications: Pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. *J Blood Med.* 2019;10:359–71.
  41. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol.* 2016;91(1):50–8.
  42. Michiels JJ. Physiopathology, etiologic factors, diagnosis, and course of polycythemia vera as related to therapy according to William Dameshek, 1940-1950. *Turkish J Hematol.* 2013;30(2):102–10.
  43. Bollmann PW, del Giglio A. Leucemia mielóide crônica: passado, presente, futuro: [revisão]. *Chronic myeloid Leuk past, Present Futur.* 2011;9(2):236–43.
  44. Chauffaille M de LLF. Neoplasias mieloproliferativas: Revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(4):308–16.
  45. Bortolheiro TC, Chiattonne CS. Leucemia mielóide crônica: História natural e classificação. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(SUPPL. 1):3–7.
  46. Rowley JD. A story of swapped ends. *Science (80- ).* 2013;340(6139):1412–3.
  47. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer.* 2016;35(1):1–15.
  48. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative neoplasms: A contemporary review. *JAMA Oncol.* 2015;1(1):97–105.
  49. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J [Internet].* 2018;8(2):15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0054-y>
  50. Lyu X, Yang J, Wang X, Hu J, Liu B, Zhao Y, et al. A novel BCR-ABL1 fusion gene identified by next-generation sequencing in chronic myeloid leukemia. *Mol Cytogenet.* 2016;9(1):1–7.
  51. Torres DG, Paes J, da Costa AG, Malheiro A, Silva G V, de Souza Mourão LP, et al. JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. Vol. 12, *Biomolecules.* 2022. p. 1–18.
  52. Vannucchi AM, Harrison CN. Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):693–703.

53. Shallis RM, Zeidan AM, Wang R, Podoltsev NA. Epidemiology of the Philadelphia Chromosome-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021;35(2):177–89.
54. Jang MA, Choi CW. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean J Intern Med.* 2020;35(1):1–11.
55. Varghese C, Immanuel T, Ruskova A, Theakston E, Kalev-Zylinska ML. The epidemiology of myeloproliferative neoplasms in new zealand between 2010 and 2017: Insights from the new zealand cancer registry. *Curr Oncol.* 2021;28(2):1544–57.
56. Lima JG, Lopes R, Barbieri T. Perfil Dos Pacientes Com Neoplasia Mieloproliferativa Cromossomo Philadelphia Negativo Na Unidade De Alta Complexidade Oncológica Do Hospital São José Em Criciúma/Sc No Período De 2008 a 2015. *Arq Catarinenses Med.* 2018;34(12):128–39.
57. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):667–79.
58. Szuber N, Vallapureddy RR, Penna D, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, et al. Myeloproliferative neoplasms in the young: Mayo Clinic experience with 361 patients age 40 years or younger. *Am J Hematol.* 2018;93(12):1474–84.
59. Srour SA, Devesa SS, Morton LM, Check DP, Curtis RE, Linet MS, et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-2012. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
60. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia.* 2022;(June).
61. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene.* 2013;32(21):2601–13.
62. Morris R, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular details of cytokine signaling via the JAK / STAT pathway. *Protein Sci.* 2018;27(12):1984–2009.
63. Quintás-Cardama A, Verstovsek S. Molecular pathways: JAK/STAT pathway: Mutations, inhibitors, and resistance. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):1933–40.
64. Burja B, Mertelj T, Frank-Bertoncelj M. Hi-JAKi-ng Synovial Fibroblasts in Inflammatory Arthritis With JAK Inhibitors. *Front Med.* 2020;7(May):1–11.
65. Gerds AT. Beyond JAK-STAT : novel therapeutic targets in Ph-negative MPN. *Am Soc Hematol Educ Progr B.* 2019;2016(1):407–14.
66. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(9):673–83.
67. National Center for Biotechnology Information N. Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2), RefSeqGene (LRG\_612) on chromosome 9 [Internet]. Vol. NG\_009904, National Library of Medicine, Rockville, USA. 2023 [cited 2022 Feb 9]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_009904.1?from=5001&to=147939&report=genbank](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_009904.1?from=5001&to=147939&report=genbank)
68. National Center for Biotechnology Information N. JAK2 Janus kinase 2 [ Homo sapiens (human) ] [Internet]. National Library of Medicine, Rockville, USA. 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3717>
69. Catarsi P, Rosti V, Morreale G, Poletto V, Villani L, Bertorelli R, et al. JAK2 exon 14 skipping in patients with primary myelofibrosis: A minor splice variant modulated by

- the JAK2-V617F allele burden. *PLoS One*. 2015;10(1):1–14.
70. Santos LC dos. Estudo Citogenético E Pesquisa De Mutações Nos Genes JAK2 E MPL Em Policitemia Vera , Mielofibrose Primária e Trombocitemia Essencial. 2010;70.
  71. Freitas MC de S. Avaliação do papel da proteína tirosina- kinase janus kinase 2 ( jak-2 ) em modelo murino de lesão hepática induzida por isquemia de perfusão. Vol. 2. Universidade Federal de São Paulo; 2010.
  72. Zhao L, Ma Y, Seemann J, Huang LJS. A regulating role of the JAK2 FERM domain in hyperactivation of JAK2(V617F). *Biochem J*. 2010;426(1):91–8.
  73. Chen E, Mullally A. How does *JAK2V617F* contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematol (United States)*. 2014;2014(1):268–76.
  74. Skov V. Next Generation Sequencing in MPNs . Lessons from the Past and Prospects for Use as Predictors of. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2194.
  75. Staerk J, Constantinescu SN. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. *Jak-Stat*. 2012;1(3):184–90.
  76. Easwar A, Siddon AJ. Genetic landscape of myeloproliferative neoplasms with an emphasis on molecular diagnostic laboratory testing. *Life*. 2021;11(11):1–22.
  77. Tapper W, Jones A V., Kralovics R, Harutyunyan AS, Zoi K, Leung W, et al. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat Commun*. 2015;6:1–11.
  78. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*. 2014;123(22):1–3.
  79. Jones A V., Cross NCP. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther Adv Hematol*. 2013;4(4):237–53.
  80. Yang WY, Hormozdiari F, Wang Z, He D, Pasaniuc B, Eskin E. Leveraging reads that span multiple single nucleotide polymorphisms for haplotype inference from sequencing data. *Bioinformatics*. 2013;29(18):2245–52.
  81. Vannucchi AM. how many faces in MPDs ? Bad news for GVHD prevention. *Blood*. 2008;111(5):2785.
  82. Macedo LC, Santos BC, Pagliarini-e-Silva S, Pagnano KBB, Rodrigues C, Quintero FC, et al. JAK2 46/1 haplotype is associated with JAK2 V617F - positive myeloproliferative neoplasms in Brazilian patients. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(5):654–60.
  83. Glusman G, Cox HC, Roach JC. Whole-genome haplotyping approaches and genomic medicine. *Genome Med*. 2014;6(9):1–16.
  84. Martínez-Trillos A, Maffioli M, Colomer D, Alvarez-Larrán A, Pereira A, Angona A, et al. Relationship between the 46/1 haplotype of the JAK2 gene and the JAK2 mutational status and allele burden, the initial findings, and the survival of patients with myelofibrosis. *Ann Hematol*. 2014;93(5):797–802.
  85. Pardnani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(5):2785–9.
  86. Ohyashiki JH, Yoneta M, Hisatomi H, Iwabuchi T, Umezu T, Ohyashiki K. The C allele of JAK2 rs4495487 is an additional candidate locus that contributes to myeloproliferative neoplasm predisposition in the Japanese population. *BMC Med Genet [Internet]*. 2012;13(1):6. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/13/6>

87. Chiang Y, Chang Y, Lin H, Huang L. Germline variations at JAK2, TERT, HBS1L-MYB and MECOM and the risk of myeloproliferative neoplasms in Taiwanese population. *Oncotarget*. 2017;8(44):76204–13.
88. Smalberg JH, Koehler E, Murad SD, Plessier A, Seijo S, Trebicka J, et al. The JAK2 46/1 haplotype in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis. *Blood*. 2011;117(15):3968–73.
89. Andrikovics H, Nahajevszky S, Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Halm G, et al. JAK2 46/1 haplotype analysis in myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24(10):1809–13.
90. Vannucchi AM, Guglielmelli P. The JAK2 46/1 (GGCC) MPN-predisposing haplotype: A risky haplotype, after all. *Am J Hematol*. 2019;94(3):283–5.
91. 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(11):1575–9.
92. Slatkin M. Linkage disequilibrium - Understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet*. 2008;9(6):477–85.
93. Calabrese B. Linkage disequilibrium. *Encycl Bioinforma Comput Biol ABC Bioinforma*. 2018;1–3(Ld):763–5.
94. Neale BM. Introduction to linkage disequilibrium, the HapMap, and Imputation. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010;5(3):10–3.
95. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68–74.
96. Pagliarini-e-Silva S, Santos BC, Pereira EM de F, Ferreira ME, Baraldi EC, Sell AM, 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.
97. Li S li, Zhang P jin, Sun G xiang, Lu Z jun. The JAK2 46/1 haplotype (GGCC) in myeloproliferative neoplasms and splanchnic vein thrombosis: a pooled analysis of 26 observational studies. *Ann Hematol*. 2014;93(11):1845–52.
98. Koh SP, Yip SP, Lee KK, Chan CC, Lau SM, Kho CS, et al. Genetic association between germline JAK2 polymorphisms and myeloproliferative neoplasms in Hong Kong Chinese population: A case-control study. *BMC Genet*. 2014;15(1):1–12.
99. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):450–4.
100. NIEHS. Servidor Web SNPinfo [Internet]. [cited 2022 Feb 12]. Available from: <https://snpinfo.niehs.nih.gov/cgi-bin/snpinfo/snptag.cgi>
101. IGSR | populations [Internet]. [cited 2022 Feb 9]. Available from: <https://www.internationalgenome.org/data-portal/population>
102. rs10974944 (SNP) - Population genetics - Homo\_sapiens - Ensembl genome browser 105 [Internet]. [cited 2022 Feb 9]. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5070331-5071331;v=rs10974944;vdb=variation;vf=731581676](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5070331-5071331;v=rs10974944;vdb=variation;vf=731581676)
103. rs3780367 (SNP) - Genética de populações - Homo\_sapiens - Ensembl genoma browser 105 [Internet]. [cited 2022 Feb 9]. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5068255-5069255;v=rs3780367;vdb=variation;vf=729888189](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5068255-5069255;v=rs3780367;vdb=variation;vf=729888189)

104. rs17302090 (SNP) - Population genetics - Homo\_sapiens - Ensembl genome browser 105 [Internet]. [cited 2022 Feb 9]. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5073689-5074689;v=rs12343867;vdb=variation;vf=732179982](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5073689-5074689;v=rs12343867;vdb=variation;vf=732179982)
105. rs1159782 (SNP) - Population genetics - Homo\_sapiens - Ensembl genome browser 105 [Internet]. [cited 2022 Feb 9]. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5077617-5078617;v=rs1159782;vdb=variation;vf=729146257#population\\_freq\\_SAS](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:5077617-5078617;v=rs1159782;vdb=variation;vf=729146257#population_freq_SAS)
106. Tashi T, Swierczek S, Prchal JT. Familial MPN Predisposition. Vol. 12, Current Hematologic Malignancy Reports. Current Hematologic Malignancy Reports; 2017. p. 442–7.
107. Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, Finke CM, Hussein K, Hogan WJ, et al. JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: Nullizygosity for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia* [Internet]. 2010;24(1):105–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.225>
108. Tefferi A, Lasho TL, Mudireddy M, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, et al. The germline JAK2 GGCC (46/1) haplotype and survival among 414 molecularly-annotated patients with primary myelofibrosis. *Am J Hematol*. 2019;94(3):299–305.
109. Wang K, Swierczek S, Hickman K, Prchal JT, Hakonarson H. Convergent Mechanisms of Somatic Mutations in Polycythemia Vera. *Physiol Behav*. 2011;12(62):25–32.
110. Olcaydu D, Rumi E, Harutyunyan A, Passamonti F, Pietra D, Pascutto C, et al. The role of the JAK2 GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011;96(3):367–74.
111. Nahajevszky S, Andrikovics H, Batai A, Adam E, Bors A, Csomor J, et al. The prognostic impact of germline 46/1 haplotype of Janus Kinase 2 in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2011;96(11):1613–8.
112. Braunstein EM, Moliterno AR. Back to Biology: New Insights on Inheritance in Myeloproliferative Disorders. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014;9(4):311–8.
113. Skoda RC. Hereditary myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2010;95(1):6–8.
114. Abruzzese E, Poeta G Del, Barbato R, Fratoni S, Trawinska MM, Zangrilli D, et al. To the editor : Discordant distribution of JAK2 V617F mutation in siblings with familial. 2015;107(11):4572–4.
115. Milosevic JD, Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int J Hematol*. 2013;97(2):183–97.
116. Williamson S. Genomics. Vol. 12, Today's Life Science. 2013. 38–39 p.
117. Hubner RA, Houlston RS. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Mol Basis Hum Cancer*. 2016;8(66):231–9.
118. Oddsson A, Kristinsson SY, Helgason H, Gudbjartsson DF, Masson G, Sigurdsson A, et al. The germline sequence variant rs2736100-C in TERT associates with myeloproliferative neoplasms. Vol. 28, *Leukemia*. 2014. p. 1371–4.
119. Cardinale CJ, March ME, Lin X, Liu Y, Spruce LA, Jonathan P, et al. Regulation of Janus Kinase 2 by an Inflammatory Bowel Disease Causal Non-coding Single Nucleotide Polymorphism. 2020;1–8.
120. Hautin M, Bernard DG, Corcos L, Lippert E. Splicing Anomalies in Myeloproliferative Neoplasms : Paving the Way for New Therapeutic Venues. 2020;1–22.
121. Morris DL, Sheng Y, Zhang Y, Wang Y, Zhu Z, Tomblinson P, et al. Genome-wide



- association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus. 2016;(December 2015).
122. Nascimento F de O. Caracterização genética do vírus sincicial respiratório humano no Amazonas em 2019. Vol. 1, Instituto Leônidas e Maria Deane. 2021.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Parecer consubstanciado do projeto Caracterização molecular de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas

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 hematopoética.

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, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)

**Bairro:** Chapada

**CEP:** 69.050-002

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3655-0114

**Fax:** (92)3655-0112

**E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 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 tornando-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, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.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_BÁSICAS_DO_PROJETO_1658907.pdf | 04/12/2020<br>18:46:29 |                               | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEfinal.pdf                                 | 04/12/2020<br>18:46:00 | ANDRÉA<br>MONTEIRO<br>TARRAGÔ | Aceito   |
| Outros  | AndreaTarrago.pdf                             | 02/12/2020<br>18:05:17 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura                              | projeto.pdf                                   | 09/11/2020<br>16:49:52 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito   |

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

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

|   |                    |                        |                               |        |
|---|--------------------|------------------------|-------------------------------|--------|
| Investigador  | projeto.pdf        | 09/11/2020<br>16:49:52 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tcle.pdf           | 09/11/2020<br>16:42:42 | ANDRÉA<br>MONTEIRO<br>TARRAGÔ | Aceito |
| Outros  | tcud.pdf           | 09/11/2020<br>16:38:18 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | hemoam.pdf         | 09/11/2020<br>16:35:37 | ANDRÉA<br>MONTEIRO<br>TARRAGÔ | Aceito |
| Folha de Rosto  | FOLHA_DE_ROSTO.pdf | 09/11/2020<br>16:29:12 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Outros  | labgen.pdf         | 09/11/2020<br>16:23:30 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Outros  | SAME.pdf           | 09/11/2020<br>16:23:05 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Emanuela.pdf       | 09/11/2020<br>16:20:31 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Lucivana.pdf       | 09/11/2020<br>16:20:05 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Wanessa.pdf        | 09/11/2020<br>16:17:36 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Nelson.pdf         | 09/11/2020<br>16:17:18 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Dania.pdf          | 09/11/2020<br>16:16:56 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Miliane.pdf        | 06/11/2020<br>18:14:02 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Juliana.pdf        | 06/11/2020<br>18:13:26 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Adriana.pdf        | 06/11/2020<br>18:12:50 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Allyson.pdf        | 06/11/2020<br>18:12:19 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                               | Andrea.pdf         | 06/11/2020<br>18:12:01 | ANDRÉA<br>MONTEIRO            | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

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:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

## 8.2.Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



### **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 contactar 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, sim 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, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



## 8.4. Protocolo de extração de DNA

### EXTRAÇÃO DE DNA – BRAZOL

#### 1.0. Fase pré-extração de DNA:

- 1) Separar as amostras que serão extraídas e descongelar naturalmente;
- 2) Certificar se o banho-maria está na temperatura ideal de 56°C;
- 3) Verificar a disponibilidade de microtubos de 2,0 mL e 1,5 mL e identifica-los;
- 4) Verificar se existe quantidade suficiente de etanol 100% e clorofórmio;
- 5) Separar caixa com gelo para manter os reagentes (todos devem ser mantidos no gelo).

#### 2.0. Fase de extração de DNA:

- 1) Pipetar 200 µL (microlitros) da amostra de sangue em um microtubo de 2,0 mL, devidamente identificados. A amostra deve ser homogeneizada antes de pipetar. Em algumas situações é possível pipetar o *buffy coat*.
- 2) Adicionar 400 µL de Brazol gelado (4°C) e agitar no vórtex até a amostra adquirir aspecto homogêneo;
- 3) Adicionar 100 µL de clorofórmio gelado (4°C) e misturar no vórtex até a amostra adquirir uma coloração “**cor de chocolate**”;
- 4) Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em T.A (22°C);
- 5) Após a centrifugação, retirar o microtubo cuidadosamente da centrífuga e verificar se a solução está dividida em duas partes;
- 6) Pipetar cuidadosamente a fase superior (**SOBRENADANTE**) e transferir para tubos de 1,5 mL identificados corretamente.

#### 3.0. Fase de precipitação do DNA genômico:

- 1) Adicionar 500 µL de etanol 100% gelado (armazenado a 4°C), homogeneizar no vórtex e observar a formação de um precipitado. O precipitado é usualmente visualizado em 30 – 60 segundos;
- 2) Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm em T.A (22°C);
- 3) Descartar o sobrenadante e adicionar novamente 500 µL de etanol 100% gelado (armazenado a 4°);
- 4) Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- 5) Descartar o sobrenadante;
- 6) Remover o etanol residual com pipeta e colocar no banho seco 56°C por 10 minutos;
- 7) Adicionar 100 µL de água destilada estéril em cada tubo (H<sub>2</sub>Odd) – **OBS.:** adicionar primeiro 50 µL, ver a concentração e, se necessário, adicionar mais 50 µL em casos em que a concentração está alta. Se estiver baixa (abaixo de 50 ng) adicionar apenas 50 µL.
- 8) Quantificar o DNA genômico no Nanodrop;
- 9) Armazenar o DNA purificado a 4°C ou -20°C.

### 8.5. Padronização de concentração das amostras de DNA

| <b>A - Concentração menor que 100 ng/uL</b>           |  |
|---|--|
| <b>AMOSTRAS</b>                                       | <b>Diluição</b>  |
| NMP4  | <b>Alíquota de 10 uL<br/>Sem diluição.</b>                     |
| NMP16   |  |
| NMP18   |  |
| NMP52   |  |
| NMP91   |  |
| <b>B - Amostras entre 100-150 ng/uL (VF = 20 uL)</b>  |  |
| <b>AMOSTRAS</b>                                       | <b>Diluição</b>  |
| NMP1  | <b>1/2</b><br><br>10 uL de amostra + 10 de H <sub>2</sub> O    |
| NMP3  |  |
| NMP8  |  |
| NMP11   |  |
| NMP14   |  |
| NMP19   |  |
| NMP27   |  |
| NMP30   |  |
| NMP40   |  |
| NMP41   |  |
| NMP42   |  |
| NMP43   |  |
| NMP57   |  |
| NMP68   |  |
| NMP72   |  |
| NMP73   |  |
| NMP75   |  |
| NMP78   |  |
| NMP80   |  |
| NMP81   |  |
| NMP83   |  |
| NMP85   |  |
| NMP92   |  |
| NMP93   |  |
| NMP108  |  |
| <b>C - Amostras entre 150 – 200 ng/uL (VF = 20uL)</b> |  |
| <b>AMOSTRAS</b>                                       | <b>Diluição</b>  |
| NMP5  | <b>1/3</b><br><br>6,6 de amostra + 13,4 uL de H <sub>2</sub> O |
| NMP6  |  |
| NMP10   |  |
| NMP12   |  |
| NMP15   |  |
| NMP17   |  |
| NMP20   |  |
| NMP23   |  |

|  |   |
|--|---|
| NMP24  |   |
| NMP32  |   |
| NMP33  |   |
| NMP38  |   |
| NMP39  |   |
| NMP54  |   |
| NMP55  |   |
| NMP58  |   |
| NMP59  |   |
| NMP60  |   |
| NMP61  |   |
| NMP62  |   |
| NMP64  |   |
| NMP70  |   |
| NMP74  |   |
| NMP76  |   |
| NMP77  |   |
| NMP79  |   |
| NMP82  |   |
| NMP86  |   |
| NMP87  |   |
| <b>D - Amostras entre 200-250 ng/uL (VF = 20 uL)</b> |   |
| <b>AMOSTRAS</b>                                      | <b>DILUIÇÕES (VF = 20uL)</b>                |
| NMP22  |   |
| NMP26  |   |
| NMP34  |   |
| NMP35  |   |
| NMP37  |   |
| NMP44  | <b>1/4</b>                                  |
| NMP45  |   |
| NMP50  | 5 uL de amostra + 15 uL de H <sub>2</sub> O |
| NMP66  |   |
| NMP67  |   |
| NMP69  |   |
| NMP71  |   |
| NMP89  |   |
| <b>E - Amostras entre 250-300 ng/dL (VF = 20 uL)</b> |   |
| <b>AMOSTRAS</b>                                      | <b>Diluição (VF = 20uL)</b>                 |
| NMP7   | <b>1/5</b>                                  |
| NMP25  |   |
| NMP47  |   |
| NMP49  | 4 uL de amostra + 16 uL de H <sub>2</sub> O |
| <b>F - Amostras entre 300-350 ng/uL</b>              |   |
| <b>AMOSTRAS</b>                                      | <b>Diluição (VF = 20uL)</b>                 |
| NMP9   | <b>1/6</b>                                  |
| NMP13  |   |
| NMP46  |   |
| NMP63  | 3,3 de amostra + 16,6 de H <sub>2</sub> O   |

|   |   |
|---|---|
| NMP65   |   |
| NMP88   |   |
| NMP94   |   |
| NMP100  |   |
| NMP101  |   |
| NMP102  |   |
| NMP105  |   |
| NMP106  |   |
| NMP107  |   |
| NMP109  |   |
| NMP110  |   |
| NMP111  |   |
| <b>G - Amostras entre 350-400 ng/uL (VF = 20 uL)</b>    |   |
| <b>AMOSTRAS</b>   | <b>DILUIÇÕES (VF = 20uL)</b>                                      |
| NMP21   |   |
| NMP31   |   |
| NMP48   | 1/7   |
| NMP51   |   |
| NMP53   | 2,85 uL de amostra + 17,15 uL de H <sub>2</sub> O                 |
| NMP90   |   |
| NMP95   |   |
| <b>H - Concentração entre 500-600 ng/uL (VF = 20uL)</b> |   |
| <b>AMOSTRAS</b>   | <b>Diluição</b>   |
| NMP29   |   |
| NMP56   |   |
| NMP84   |   |
| NMP96   | 1/10  |
| NMP97   |   |
| NMP99   | 2 uL de amostra + 18 uL de H <sub>2</sub> O                       |
| NMP103  |   |
| NMP104  |   |
| <b>I - Amostras acima de 1000 ng/uL</b>                 |   |
| <b>AMOSTRAS</b>   | <b>Diluição</b>   |
| NMP2  | 1/20 – VF = 40 uL<br><br>2 de amostra e 38 uL de H <sub>2</sub> O |

## 8.6. Protocolo – Reação em cadeia da polimerase: íntron 12

### I) Dados do primer

| Primer     | Sequência (5' – 3')     | Tm   | Amplicom | SNV na região     |
|------------|-------------------------|------|----------|-------------------|
| Íntron12FW | CCAAGTGGAGTTTCCTTGCAG   | 58°C | 572 pb   | <i>rs10974944</i> |
| Íntron12RV | CTAGGTTAAGAGTATGTGGTTCC |      |          |                   |

### II) PCR

| MIX PARA PCR             |                        |                          |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| Regentes                 | Concentração da reação | 1 reação (VF = 25 µL)    |
| H <sub>2</sub> O         | -                      | 17,05                    |
| Tampão (10x)             | 1x                     | 2,5 µL                   |
| MgCl <sub>2</sub> (50Mm) | 1,5mM                  | 0,75 µL                  |
| Primer FW (10 µM)        | 0,4 µM                 | 1 µL                     |
| Primer RV (10 µM)        | 0,4 µM                 | 1 µL                     |
| dNTP mix (10 mM)         | 0,2 mM                 | 0,5 µL                   |
| TAQ 5U/µL                | 1 U                    | 0,2 µL                   |
| DNA                      | > 30 ng                | 2 µL                     |
| TOTAL                    | -                      | 25 µL (24 µL + 1 µL DNA) |

#### 1. ETAPAS:

Antes da reação: (1) preparar transporte com gelo; colocar água na UV; (2) deixar os reagentes descongelar totalmente; (3) homogeneizar cada reagentes antes de pipetá-lo no mix; (4) identificar os mix e microtubos de 0,2 mL antes da reação; (5) manter a TAQ e o dNTP na geladeira, retirando-os somente no momento da adição no mix; (6) fazer 2 reações a mais: 1 para ser o branco (sem o DNA) e a outra para deixar como volume reserva.

- Identificar microtubo de 2 mL para preparo do Mix;
- Identificar tubos de 0,2 mL;
- Fazer o preparo do mix no microtubo de 2 mL;
- Distribuir 24 µL de mix para os microtubos de 0,2 mL e adicionar 1 µL de amostras de DNA;
- Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo

### III) Programação do termociclador

| CICLAGEM PARA PCR – íntron 12 |                      |             |        |
|-------------------------------|----------------------|-------------|--------|
| Temperatura                   | Fase                 | Tempo       | Ciclos |
| 94°C                          | Desnaturação inicial | 4 minutos   | 1      |
| 94°C                          | Desnaturação         | 30 segundos | 40     |
| 58°C                          | Anelamento           | 30 segundos |        |
| 72°C                          | Extensão             | 40 segundos |        |
| 72°C                          | Extensão final       | 7 minutos   | 1      |
| 4°C                           | ∞                    | -           | -      |

**Ao final:** Correr as amostras em gel de Agarose ao 1,5 % corado com brometo de etídio.

## 8.7. Protocolo – Reação em cadeia da polimerase: Promotor



## I) Dados do primer

| Primer     | Sequência (5' – 3')       | Tm   | Amplicon | SNVs na região   |
|------------|---------------------------|------|----------|--|
| PromotorFW | GTCATGGGACTGGTTCATTCTCATC | 64°C | 673 pb   | <i>rs6476933,</i><br><i>rs73389454,</i><br><i>rs1887428, rs1887429</i> |
| PromotorRV | TTTCGGCTTTTCCTTCCACCTCC   |      |          |  |

## II) PCR

| MIX PARA PCR             |                        |                          |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| Regentes                 | Concentração da reação | 1 reação (VF = 25 µL)    |
| H <sub>2</sub> O         | -                      | 17,55                    |
| Tampão (10x)             | 1x                     | 2,5 µL                   |
| MgCl <sub>2</sub> (50Mm) | 2,5mM                  | 1,25 µL                  |
| Primer FW (10 µM)        | 0,4 µM                 | 1 µL                     |
| Primer RV (10 µM)        | 0,4 µM                 | 1 µL                     |
| dNTP mix (10 mM)         | 0,2 mM                 | 0,5 µL                   |
| TAQ 5U/µL                | 1 U                    | 0,2 µL                   |
| DNA                      | > 30 ng                | 1 µL                     |
| TOTAL                    | 25 µL                  | 25 µL (24 µL + 1 µL DNA) |

## 1. ETAPAS:

**Antes da reação:** (1) preparar transporte com gelo; colocar água na UV; (2) deixar os reagentes descongelar totalmente; (3) homogeneizar cada reagentes antes de pipetá-lo no mix; (4) identificar os mix e microtubos de 0,2 mL antes da reação; (5) manter a TAQ e o dNTP na geladeira, retirando-os somente no momento da adição no mix; (6) **fazer 2 reações a mais: 1 para ser o branco (sem o DNA) e a outra para deixar como volume reserva, ou seja, se forem feitas 15 amostras, 17 reações devem ser calculadas**

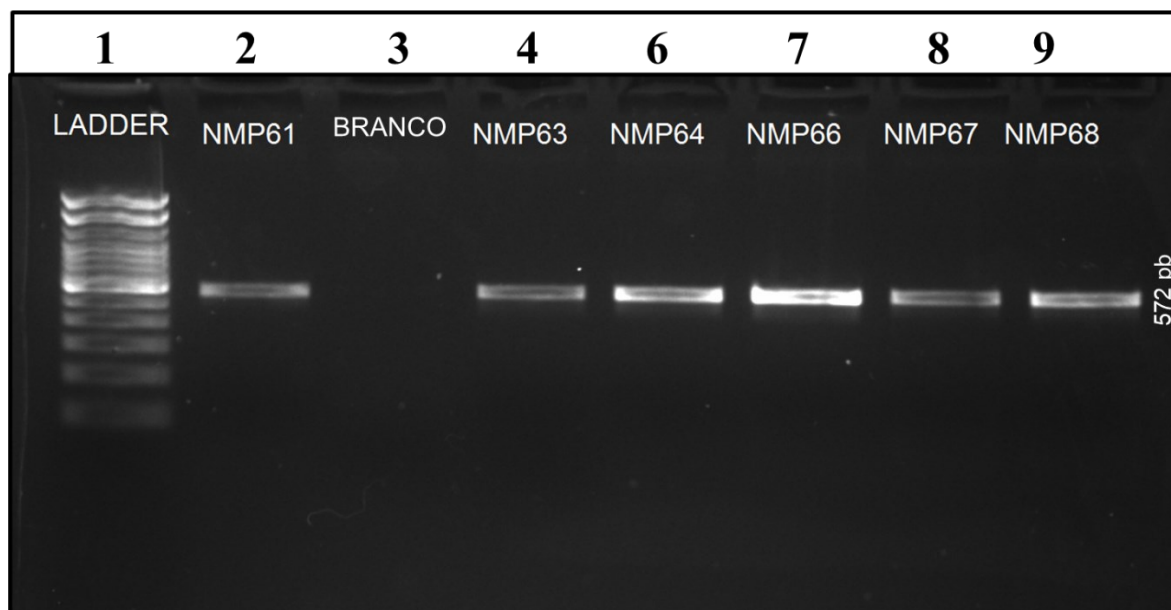
- Identificar microtubo de 2 mL para preparo do Mix;
- Identificar tubos de 0,2 mL;
- Fazer o preparo do mix no microtubo de 2 mL;
- Distribuir **24 µL de mix** para os microtubos de 0,2 mL e **Adicionar as 1 µL de DNA**
- Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo

## III) Programação do termociclador

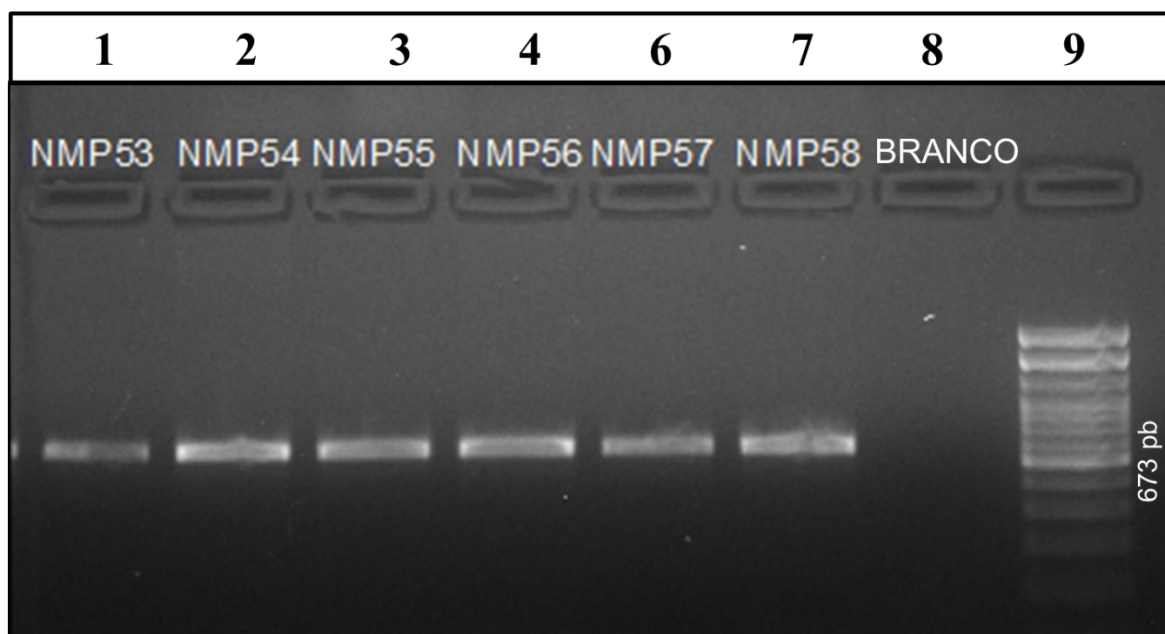
| CICLAGEM PARA PCR – promotor |                             |             |        |
|------------------------------|-----------------------------|-------------|--------|
| Temperatura                  | Fase                        | Tempo       | Ciclos |
| 94°C                         | <b>Desnaturação inicial</b> | 4 minutos   | 1      |
| 94°C                         | <b>Desnaturação</b>         | 30 segundos | 40     |
| 64°C                         | <b>Anelamento</b>           | 30 segundos |        |
| 72°C                         | <b>Extensão</b>             | 45 segundos |        |
| 72°C                         | <b>Extensão final</b>       | 7 minutos   | 1      |
| 4°C                          | ∞                           | -           | -      |

**Ao final:** Correr as amostras em gel de Agarose ao 1,5% corado com brometo de etídio.

## 8.7.1 – Géis de eletroforese



**Figura 8.8.1:** Gel de eletroforese de região amplicada do íntron 12 de JAK2, determinada pelo fragmento de 572 pb. Linha 1: Ladder 100 pb; Linha 3: Branco (controle negativo); Linhas 1,4-9: amostras de pacientes incluídos no estudo.



**Figura 8.8.2:** Gel de eletroforese de região amplicada do promotor de JAK2, determinada pelo fragmento de 673 pb. Linha 1 a 7: amostras de pacientes incluídos no estudo; Linha 8: Branco (controle negativo), Linhas: 9: Ladder 100 pb.

## 8.8. Protocolo: 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°C. \*LEMBRE-SE: Antes de armazenar as amostras a -80°C, armazene a 4-5°C por algumas horas para melhor eluição de DNA.
- 9- Quantificar as amostras pelo menos 3 dias após precipitação, passando do freezer (-80°C) à geladeira 4-5°C pelo menos 2 H antes da quantificação.

### 8.9.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 |           |
| Stage 3 | 96°C por 10 seg        | 5 ciclos  |
|         | 55°C por 15 seg        |           |
|         | 60°C por 1 min, 30 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   |

### **8.10. Purificação do sequenciamento (Método EDTA/Etanol)**

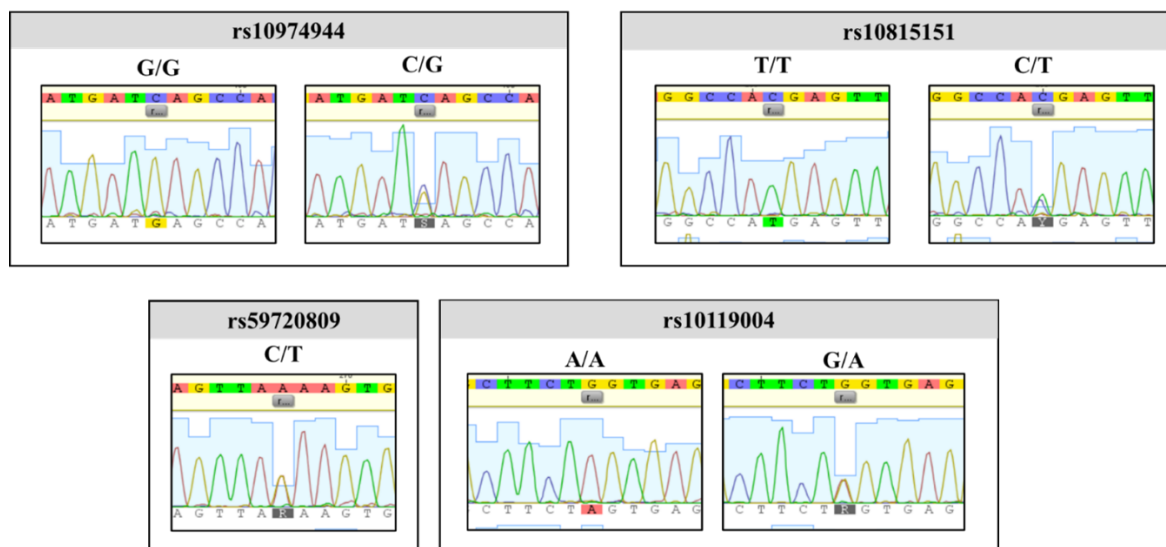
- 1- Após reação de sequenciamento, centrifugar a placa a 2000 rpm x 2 min a 4°C. 2- Em cada poço, adicionar:
  - 2,5 uL de EDTA (125 mM)
  - 25 uL de etanol 100% gelado
- 3- Realizar um spin e incubar a temperatura ambiente e protegido da luz por 15 min. 4- Centrifugar a 2000 rcf x 45 min a 4°C.
- 5- 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.

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

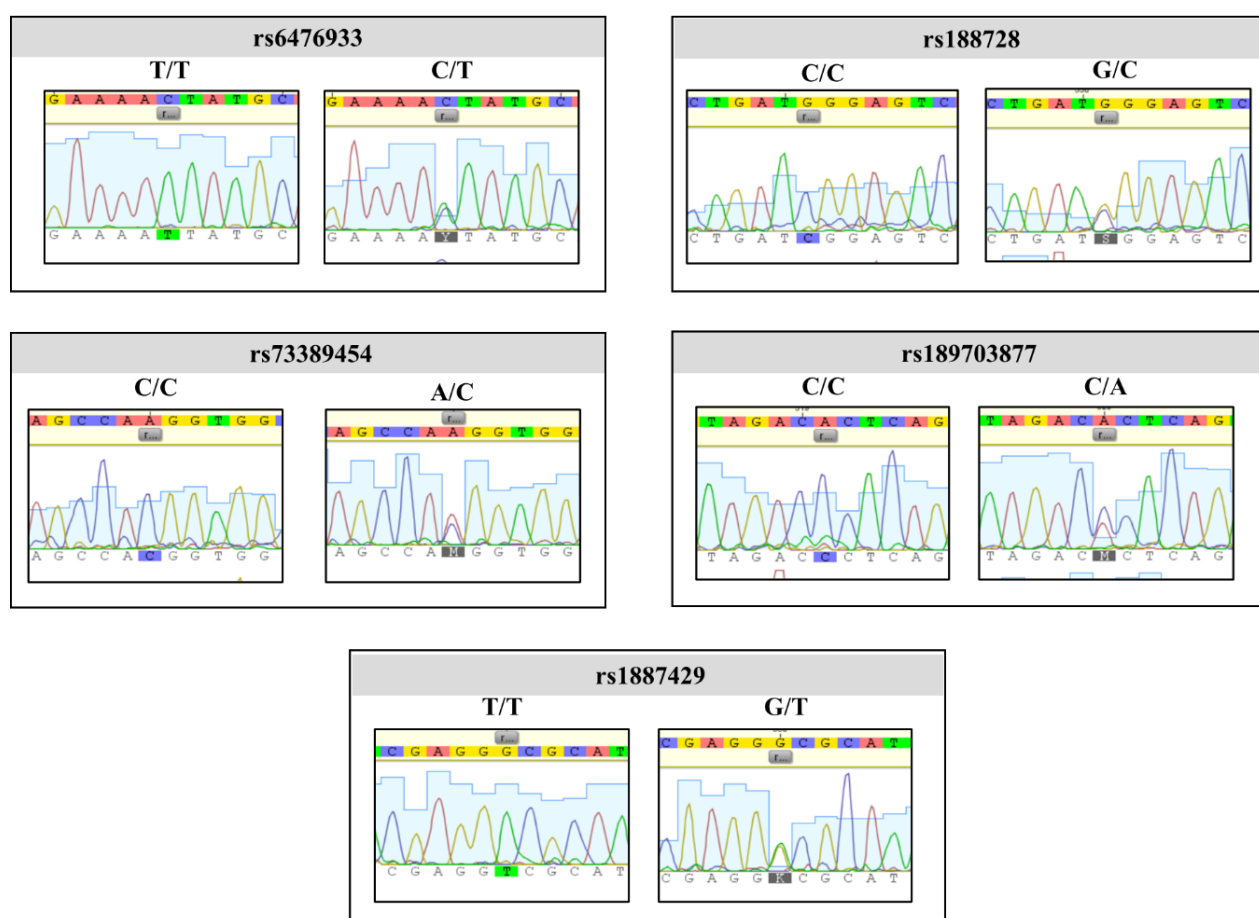
Prepare o termociclador ou termobloco a 95°C.

- 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)

## 8.12. Variantes identificadas por sequenciamento de Sanger



**Figura 8.12.1:** variantes identificadas no íntron 12 do gene JAK2 durante o sequenciamento de Sanger. Identificação baseada na sequência de referência do gene *JAK2* (NG\_009904.1) usando o software Geneious



**Figura 8.12.2:** variantes identificadas no promotor do gene JAK2 durante o sequenciamento de Sanger. \*identificação baseada na sequência de referência do gene *JAK2* (NG\_009904.1) usando o software Geneious.

### 8.13. Resumos publicados em anais de eventos



7<sup>TH</sup> INTERNATIONAL  
SYMPOSIUM ON  
IMMUNOLOGY AND  
HEMATOLOGY

*Scientia Amazonia*, v. 12, n.1, B1-B12, 2023

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8061460>



Realization - November 30th and December 2nd, 2022 – Manaus – Amazonas -Brazil

#### RARE CASE OF FAMILIAL MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASM IDENTIFIED IN PATIENTS AT THE HEMOAM FOUNDATION

Jhemerson Fernandes Paes<sup>1\*</sup>; Dania Isamary Gutiérrez Torres; Emanuela Vitória Barbosa Alves<sup>1</sup> Miliane Araújo de Sousa<sup>1</sup>; Rosângela Santos de Abreu<sup>1,2</sup>; Nelson Abrahim Fraiji<sup>1,2</sup>; George Allan Villarouco da Silva<sup>1,4,5</sup>; Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,3,5</sup> & Lucivana Prata de Souza Mourão<sup>1,6</sup>

<sup>1\*</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

<sup>2</sup> Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 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> Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz), Manaus, AM, Brazil;

<sup>5</sup> Fundação Centro Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), Manaus, AM, Brazil;

<sup>6</sup> Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil.

**Background:** Myeloproliferative neoplasms are clonal hematopoietic stem cell diseases characterized by hyperplasia of elements of the myeloid series. Essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis are the most frequent, and are differentiated by laboratory, clinical and genetic parameters. *JAK2V617F* (rs77375493; c.1849G>T) is responsible for most cases of these diseases, whereas inherited factors alter the risks at each stage of development of the disease. Hereditary predisposition is rare in myeloproliferative neoplasms, and is characterized by low penetrance, presence of somatic genetic variants, risk of progression to acute myeloid leukemia and its occurrence in two or more members of the same family. This study describes a rare case of familial myeloproliferative neoplasms identified among patients treated at the HEMOAM Foundation. **Methods:** Analysis of the medical records in the period 2021-2022 of patients who agreed to participate in the research. Clinical, laboratory data, hemorrhagic and thrombotic events, and mutational status of *JAK2V617F* were evaluated. **Results:** A family grouping was identified with three individuals (mother and two daughters) diagnosed with polycythemia vera: Patient A female, 78 years old, matriarch of the family, treated since 2018 when she had a hypotensive episode with transient cerebral ischemic crisis; in 2020, she was diagnosed with Alzheimer's, carries *JAK2V617F*, variant in heterozygosity (G/T), and is treated with therapeutic bleeding. Patient B female, 53 years old, treated at the HEMOAM Foundation since 2017; six months before diagnosis, she presented nighttime itching, blurred vision, holocranial headache, paresthesia, dizziness, syncope and vomiting; she is hysterectomized, had cysts laterally in the breast in 2017, she is hypertensive, also has gastritis and erosive duodenitis, and carries the *JAK2V617F* variant in heterozygosity (G/T); she has been treated with hydroxyurea and acetylsalicylic acid. Patient C 46 years old, female, treated at the foundation since 2016; she has a clinical diagnosis of Budd-Chiari syndrome, presented with splenomegaly in 2016, carries the *JAK2V617F* variant in homozygosity (T/T), undergoes therapeutic bleeding and takes hydroxyurea. **Conclusion:** the clinical and genetic findings are consistent with those described in the literature on familial myeloproliferative neoplasms. Investigating other molecular information for germline variants may help to understand the molecular landscape involved in familial cases of these diseases.

**Keywords:** heredity; bone marrow neoplasms; polycythemia vera; JAK2.

**Financial Support:** FAPEAM and CAPES.





7<sup>TH</sup> INTERNATIONAL  
SYMPOSIUM ON  
IMMUNOLOGY AND  
HEMATOLOGY

*Scientia Amazonia*, v. 12, n.1, B1-B12, 2023

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8061460>



Realization - November 30th and December 2nd, 2022 – Manaus – Amazonas -Brazil

### THREE CASES OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS IDENTIFIED BEFORE THE THIRD DECADE OF LIFE AMONG PATIENTS TREATED AT THE HEMOAM FOUNDATION

Jhemerson Fernandes Paes<sup>1\*</sup>; Dania Isamary Gutiérrez Torres<sup>1</sup>; Deborah Canté de Aquino<sup>1</sup>; Erycka Alves de Mesquita<sup>1</sup>; Eudes Oliveira da Silveira; Nelson Abrahim Fraiji<sup>1,2</sup>; George Allan Villarouco da Silva<sup>1,4,5</sup>; Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,3,5</sup>; & Lucivana Prata de Souza Mourão<sup>1,6</sup>

<sup>1\*</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

<sup>2</sup> Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 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> Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz), Manaus, AM, Brazil;

<sup>5</sup> Fundação Centro Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), Manaus, AM, Brazil;

<sup>6</sup> Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil.

**Background:** Myeloproliferative neoplasms are hematological diseases characterized by the overproduction of blood cells. Polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis are the most frequent *BCR-ABL1* negative myeloproliferative neoplasms (incidence: 0.3-4.0 cases per 100,000 individuals) and affect individuals between the fifth and seventh decades of life. It is believed that this age group is more affected due to the accumulation of somatic genetic variations in hematopoietic genes (*JAK2* and others) over the years. Cases of myeloproliferative neoplasms before the third decade of life are rare, and the causes of their development are still not fully understood. A history of hematologic malignancies in the family and the presence of germline variants are hypotheses. The present study describes cases of myeloproliferative neoplasms identified before the third decade of life among patients treated at the HEMOAM Foundation.

**Method:** Analysis of the medical records in the period 2021-2022 of patients who agreed to participate in the research. Clinical data, bleeding and thrombotic events, and mutational status of the *JAK2V617F* variant were evaluated. Molecular analysis to identify the rs10974944 (C>G), a marker of the *JAK2* 46/1 haplotype, was performed using Sanger sequencing. **Results:** 109 patients were included in the study; 3 (2.7%) cases were identified before the third decade of life. Patient V.G.S, female, 21 years old, clinical diagnosis of essential thrombocythemia and hypermenorrhagia, under treatment with hydroxyurea. Patient L.P.S.S, 20 years old, clinical diagnosis of polycythemia vera, presented pulmonary arterial hypertension and does not receive treatment. Patient F.A.L, 23 years old, clinical diagnosis of essential thrombocythemia, hypermenorrhagia; has been treated with hydroxyurea and acetylsalicylic acid; has a history of other neoplasms in the family (mother has uterine cancer, uncle has lymphoma). All patients are negative for *JAK2V617F*, but only V.G.S and L.P.S.S were positive for haplotype 46/1 (genotype G/G and G/C, respectively) **Conclusion:** The cases identified in the sample universe demonstrate the rarity of juvenile cases. Absence of the *JAK2V617F* variant, the protagonist in the etiopathogenesis of these diseases, and presence of *JAK2* 46/1 haplotype, a risky germline variant, demonstrates the need to investigate other genes and germline variants involved in the pathogenesis of these cases.

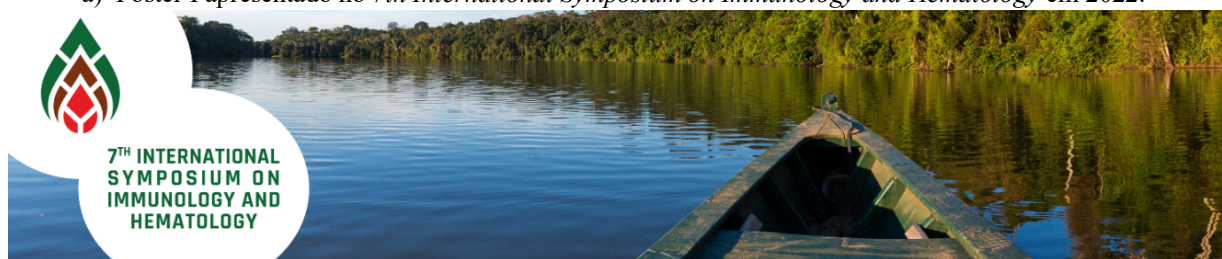
**Keywords:** polycythemia vera; essential thrombocythemia; primary myelofibrosis; *JAK2*.

**Financial Support:** FAPEAM and CAPES.



## 8.14. Divulgação científica e participação em eventos

a) Pôster I apresentado no *7th International Symposium on Immunology and Hematology* em 2022.



7<sup>TH</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOLOGY AND HEMATOLOGY

ISIH030

### RARE CASE OF FAMILIAL MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASM IDENTIFIED IN PATIENTS FROM THE HEMOAM FOUNDATION

Jhemerson Fernandes Paes<sup>1\*</sup>; Dania Isamary Gutiérrez<sup>1</sup>; Emanuela Vitória Barbosa Alves<sup>1</sup>; Miliane Alves de Sousa<sup>1</sup>; Rosângela Santos de Abreu<sup>1,2</sup>; Nelson Abrahim Fraiji<sup>1,2</sup>; Allan Villarouco da Silva<sup>1,4,5</sup>; Andréa Monteiro Tarragó<sup>1,3,5</sup>; and Lucivana Prata de Souza Mourão<sup>1,6</sup>

<sup>1\*</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil; <sup>2</sup>Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 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> Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz), Manaus, AM, Brazil; <sup>5</sup> Fundação Centro Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), Manaus, AM, Brazil; <sup>6</sup> Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil.

#### BACKGROUND

Myeloproliferative neoplasms are clonal hematopoietic stem cell diseases characterized by hyperplasia of elements of the myeloid series. Essential thrombocythemia, Polycythemia vera and Myelofibrosis are the most frequent, differentiated by laboratory, clinical and genetic parameters.

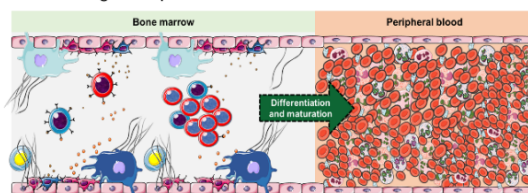
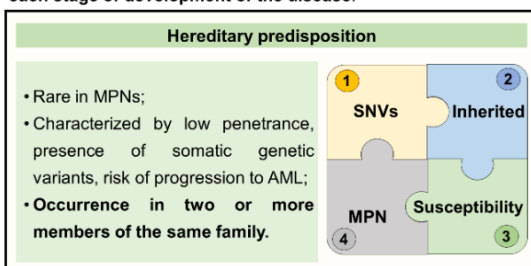


Figure 1: Clonal myeloproliferative disorder in myeloproliferative neoplasms. Authors: Paes, J.; Silva, GAV; Tarragó, AM; Mourão (2022).

*JAK2V617F* (rs77375493; c.1849G>T) is responsible for most cases of these diseases, whereas **inherited factors alter risk at each stage of development of the disease.**



This work describes a rare case of familial myeloproliferative neoplasms identified among patients treated at the HEMOAM Foundation

#### METHODS

Analysis of medical records of patients who agreed to participate in the research between 2021-2022.



Laboratory



Clinical



Hemorrhagic/thrombotic events



*JAK2V617F* status

Patrocinadores:



#### RESULTS

A family grouping was identified with three individuals (mother and two daughters) diagnosed with Polycythemia vera:

Table 1: Clinical and molecular findings of the identified family group. MPN: Myeloproliferative neoplasm; PV: Polycythemia vera; Tromb.: Trombotic; Hemor.: Hemorrhagic. G: Guanine; T: Timine.

|                  | Mother   | Daughter 1 | Daughter 2        |
|------------------|----------|------------|-------------------|
|                  |          |            |                   |
|                  | A.P.B.F  | A.B.O      | A.B.O             |
| MPN              | PV       | PV         | PV                |
| Gender           | Feminine | Feminine   | Feminine          |
| Age              | 78       | 53         | 46                |
| <i>JAK2V617F</i> | G/T      | G/T        | T/T               |
| Splenomegaly     | No       | No         | Yes               |
| Tromb. events    | No       | No         | Yes (Budd-Chiari) |
| Hemor. events    | No       | No         | No                |

All share the genetic variant and present, however, daughter 2 (A.B.O) presents the most severe clinical condition, as described in the literature.

#### CONCLUSION

The clinical and genetic findings are consistent with those described in the literature on familial myeloproliferative neoplasms. Investigating other molecular information for germline variants may help to understand the molecular landscape involved in familial cases of these diseases.

For more information, access the research group articles:



Torres et al. (2022)



Paes et al. (2022)

Organizadores:



B) Pôster II apresentado no *7th International Symposium on Immunology and Hematology* em 2022.



ISIH031

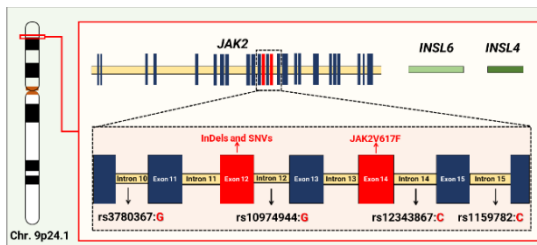
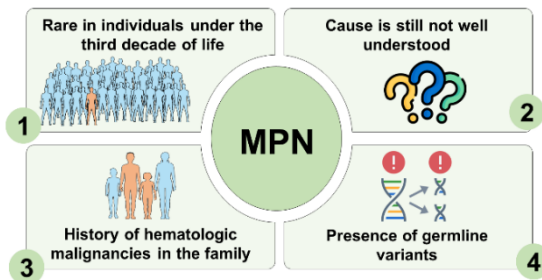
## 3 CASES OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS IDENTIFIED BEFORE THE THIRD DECADE OF LIFE AMONG PATIENTS ASSISTED AT THE HEMOAM FOUNDATION

Jhemerson Fernandes Paes<sup>1\*</sup>; Dania Isamary Gutiérrez Torres<sup>1</sup>; Deborah Canté de Aquino<sup>1</sup>; Erycka Alves de Mesquita<sup>1</sup>; Eudes Oliveira da Silveira<sup>2</sup>; Nelson Abrahim Fraiji<sup>1,2</sup>; George Allan Villarouco da Silva<sup>1,4,5</sup>; Andréa Monteiro Tarragó<sup>1,3,5</sup> and Lucivana Prata de Souza Mourão<sup>1,6</sup>

<sup>1\*</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil; <sup>2</sup>Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 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>Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz), Manaus, AM, Brazil; <sup>5</sup>Fundação Centro Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), Manaus, AM, Brazil; <sup>6</sup>Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil.

### BACKGROUND

Polycythemia vera, Essential thrombocythemia and Myelofibrosis are the most frequent *BCR-ABL1* negative myeloproliferative neoplasms (incidence: 0.3-4.0 cases per 100,000 individuals) and affect individuals between the **fifth and seventh decades of life**.



**Figure 1:** Schematic representation of the 46/1 haplotype based on the *JAK2* gene reference sequence. **Authors:** Paes, J.; Silva, GAV; Tarragó, AM; Mourão (2022).

### METHODS

Analysis of medical records of patients who agreed to participate in the research between 2021-2022. Clinical data, bleeding and thrombotic events, and mutational status of *JAK2V617F* variant were evaluated. Molecular analysis to identify the rs10974944 (C>G), a marker of the *JAK2* 46/1 haplotype, was performed using the Sanger Sequencing

Patrocinadores:



### RESULTS

109 patients were included in the study. **3 (2.7%)** cases were identified before the third decade of life:

#### F.A.L

- ✓ Female;
- ✓ 23 years old;
- ✓ clinical diagnosis of essential thrombocythemia;
- ✓ Hypermenorrhagia;
- ✓ Treated with hydroxyurea and acetylsalicylic acid;
- ✓ History of other neoplasms in the family.



#### V.G.S

- ✓ Female;
- ✓ 21 years old;
- ✓ clinical diagnosis of essential thrombocythemia;
- ✓ Hypermenorrhagia;
- ✓ Treated with hydroxyurea.



#### L.P.S.S

- ✓ Female;
- ✓ 20 years old;
- ✓ Clinical diagnosis of polycythemia vera;
- ✓ presented pulmonary arterial hypertension;
- ✓ Does not receive drug treatment.



All patients are negative for *JAK2V617F*, but only **V.G.S** and **L.P.S.S** were positive for haplotype 46/1 (genotype G/G and G/C, respectively).

### CONCLUSION

The cases identified in the sample universe demonstrate the rarity of juvenile cases. Absence of the *JAK2V617F* variant, the protagonist in the etiopathogenesis of these diseases, and presence of *JAK2* 46/1 haplotype, a risky germline variant, demonstrates the need to investigate other genes and germline variants involved in the pathogenesis of these cases.

For more information, access the research group articles:



Organizadores:

Torres et al. (2022)

Paes et al. (2022)