

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Carine Meinerz

**FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO JAK2V617F EM PACIENTES COM
TROMBOCITOSE NO INTERIOR DO RS**

Santa Maria, RS
2020

Carine Meinerz

**FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO JAK2V617F EM PACIENTES COM
TROMBOCITOSE NO INTERIOR DO RS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Santa Maria, RS
2020

Meinerz, Carine
Frequência da mutação JAK2V617F em pacientes com
trombocitose no interior do RS / Carine Meinerz.- 2020.
44 f.; 30 cm

Orientador: José Edson Paz da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. Plaquetas 2. Neoplasia Mieloproliferativa 3.
Ambulatorial 4. Triagem molecular I. Paz da Silva, José
Edson II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, CARINE MEINERZ, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Carine Meinerz

**FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO JAK2V617F EM PACIENTES COM
TROMBOCITOSE NO INTERIOR DO RS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 06 de março de 2020:



José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Karen Freitas Santos, Dra.



Priscila de Arruda Trindade, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus filhos, Valentim e Vicente, que são minha motivação em buscar sempre a melhor versão de mim. Que um dia eu seja inspiração para vocês, meus amores.

AGRADECIMENTOS

Quando aprendemos a ser gratos, a vida passa a ter um novo significado. Para a execução deste trabalho, recebi tanto amor em forma de auxílio, das mais diversas formas, que transbordo em gratidão. Agradeço:

- ao meu orientador, José Edson Paz da Silva, pela confiança depositada em mim e por permitir a concretização desta conquista;
- à minha querida Maria do Carmo, por ser mentora e incentivadora. Por ser amiga, confidente, conselheira e psicóloga. Por sua competência e caráter únicos. Por simplesmente estar sempre ali;
- à minha amiga Patrícia, por me emprestar um pouco do seu imenso conhecimento, e ser a minha salvação em dias nublados;
- ao professor Bruno, por abrir as portas do seu laboratório e me acolher de forma tão gentil. Por me fazer sentir capaz e me motivar a ser persistente;
- aos proprietários e colaboradores do laboratório Labimed, por permitirem a utilização de seus dados para a realização deste projeto e por me auxiliarem na seleção dos pacientes;
- ao meu incrível companheiro de vida, Aldo, por me fazer sentir amada, acolhida, amparada. Por me entender tanto e por ser minha paz. Pela nossa família linda. Desde o momento que nos unimos, tudo passou a dar muito certo;
- aos meus colegas do setor de Hemato-Oncologia do HUSM, por fazerem tanto com tão pouco. Por me incentivarem. Por me darem a cobertura necessária que precisei por inúmeras vezes;
- à chefia do LAC, por autorizar meu afastamento e dedicação a este projeto;
- à minha irmã, Gisele, por todo o suporte emocional e técnico. Por me emprestar um pouco da sua genialidade. E ao seu companheiro, Marcelo, por entender o quanto eu preciso dela;
- à minha mãe amada, Nara, responsável por tudo que sei e por tudo que sou, pelo seu incentivo contínuo ao estudo e seu amor e suporte incondicionais;
- ao meu pai, Ivo, e sua querida Lúcia, por aceitarem as minhas escolhas;

- à minha sogra, Maria Elisabete, por toda a contribuição e disponibilidade em todos os dias. Ter você por perto me traz segurança;
- à Universidade Federal de Santa Maria, por me acolher como aluna, me surpreender pela seriedade e qualidade, e me permitir concretizar este estudo;
- aos colegas do PPGCFAR, especialmente à Fernanda Licker, que me ajudou inúmeras vezes, com informações, prazos, dicas e, inclusive, cuidando do meu bebê enquanto eu apresentava o projeto de Mestrado;
- aos professores e colaboradores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que contribuíram para esta conquista, sempre tão carinhosos comigo, com minha barriga e com o meu bebê;
- aos meus amigos e familiares, espalhados por esse mundo, por entenderem o meu cansaço e minha ausência em momentos específicos

“A grandeza de um ser humano não está no
quanto ele sabe, mas no quanto ele tem
consciência que não sabe.”

(Augusto Cury)

RESUMO

FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO JAK2V617F EM PACIENTES COM TROMBOCITOSE NO INTERIOR DO RS

AUTOR: Carine Meinerz

ORIENTADOR: Prof.Dr. José Edson Paz da Silva

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) são desordens das células tronco hematopoiéticas, com caráter clonal, que resultam na produção excessiva de células sanguíneas diferenciadas e completamente funcionais, podendo ser em uma ou em múltiplas linhagens. A presença da mutação JAK2V617F é um dos critérios diagnósticos para as NMP, sendo a sua pesquisa recomendada para os casos de eritrocitose ou trombocitose sem causa determinada. O objetivo deste estudo é caracterizar os casos de trombocitose de pacientes ambulatoriais quanto ao seu perfil hematológico e à presença da mutação JAK2V617F. Para tanto, foram selecionadas aleatoriamente amostras ambulatoriais de hemograma, coletadas durante o período de 9 meses em um laboratório privado de Santa Maria, RS. As amostras de 260 pacientes com idade superior ou igual a 18 anos, que apresentaram contagens de plaquetas superiores ou iguais a 450.000/mm³ foram submetidas à extração de DNA e subsequente pesquisa da mutação JAK2V617F, realizada por PCR convencional baseada no sistema ARMS. Para os pacientes selecionados, foram disponibilizados os dados referentes ao perfil demográfico (idade e sexo) e perfil hematológico (dados do hemograma). A análise dos dados foi realizada através da classificação dos pacientes em dois grupos: positivos para mutação JAK2V617F (JP) e negativos para a mutação (JN) e os dados demográficos e hematológicos de ambos os grupos foram comparados utilizando o programa SPSS, versão 20. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados de $p < 0.05$. A frequência de casos com trombocitose em pacientes ambulatoriais foi de 1.0%. Dos pacientes selecionados para o estudo, verificou-se a presença da mutação JAK2V617F em 7.7% dos casos. Os pacientes positivos para a mutação apresentaram idade ($p = 0.039$), contagens de plaquetas ($p < 0.001$) e eritrócitos ($p < 0.0001$) e níveis de hematócrito ($p < 0.0001$) e hemoglobina ($p < 0.0001$) significativamente superiores ao grupo negativo para a mutação. A presença da mutação não foi mais frequente em um dos gêneros. Quanto ao perfil hematológico do grupo JP, 35% dos pacientes apresentaram eritrocitose e 45% leucocitose combinadas com a trombocitose. O aumento das três linhagens celulares foi verificado em 20% e a trombocitose isolada em 15% dos pacientes deste grupo. A presença da mutação JAK2V617F foi um achado significativo dentro da amostragem ambulatorial, utilizada para este estudo. Sua positividade esteve associada de forma significativa a alterações específicas no perfil hematológico destes pacientes, como aumento da massa eritrocitária e dos níveis de hemoglobina e hematócrito. Nestes casos, a utilização da pesquisa desta mutação como exame de triagem diagnóstica para NMP apresenta relevância e auxilia o diagnóstico precoce destas malignidades.

Palavras-chave: Plaquetas. Neoplasia Mieloproliferativa. Ambulatorial. Triagem molecular.

ABSTRACT

FREQUENCY OF JANUS KINASE 2 V617F MUTATION IN OUTPATIENTS WITH THROMBOCYTOSIS IN SANTA MARIA, BRAZIL

AUTHOR: Carine Meinerz
ADVISOR: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are unique hematopoietic stem-cell disorders, resulting in an increased proliferation of single or multilineage mature hematopoietic cells. JAK2V617F mutation is a diagnostic criterion for MPN, indicated in cases of erythrocytosis or thrombocytosis with undetermined causes. This study aims to characterize the cases of outpatients with thrombocytosis, regarding their hematological profile and the presence of JAK2V617F mutation. We selected 260 outpatients attended in a private clinical laboratory in Santa Maria, RS, for a blood count exam, within a 9-month period. These patients were older than 18 years and their platelet counts results $\geq 450.000 /\text{mm}^3$. Data regarding demographic profile (sex and age) and hematological profile (blood count parameters) were made available. Their blood samples were submitted to DNA extraction and JAK2V617F mutation detection by ARMS system. Statistical analysis was performed by classifying patients into two groups: positive for JAK2V617F mutation (JP group) and negative for the mutation (JN group). Demographic and hematological data from both groups were compared using SPSS program, version 20. Results of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Thrombocytosis was present in 1.0% of outpatients. Of these, 7.7% were positive for JAK2V617F mutation. Patients of the JP group had age ($p = 0.039$), platelet ($p < 0.001$) and erythrocytes ($p < 0.0001$) counts and hematocrit ($p < 0.0001$) and hemoglobin ($p < 0.0001$) levels significantly higher than JN. There was no difference in the frequency of the mutation among gender. The hematological profile of JP group showed combined erythrocytosis and leukocytosis in 35% and 45% of patients, respectively. Trilineage cellular hyperplasia was present in 20% and isolated thrombocytosis in 15% of patients in this group. The presence of JAK2V617 in Brazilian outpatients with thrombocytosis was substantial. Its presence was significantly associated with specific changes in the hematological profile of these patients, such as increased erythrocyte mass and hemoglobin and hematocrit levels. In these cases, the use of this mutation as a screening test for MPN is relevant and might help the early diagnosis of these malignancies.

Keywords: Platelets. Myeloproliferative neoplasm. Ambulatory. Molecular screening.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CALR	Calreticulina
CPL	Célula Progenitora Linfoide
CPM	Célula Progenitora Mieloide
CTH	Célula-tronco Hematopoietica
CTH - CP	Célula-tronco Hematopoietica de Curto Prazo
CTH - LP	Célula-tronco Hematopoietica de Longo Prazo
ET	Essential Thrombocythemia
FERM	Four-point-one Ezrin Radixin Moesin
JAK2	Janus Kinase 2
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
MO	Medula óssea
MPL	Myeloproliferative Leukemia Virus
MPN	Myeloproliferative Neoplasm
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEM	Precursor Eritroide-megacariocítico
PGM	Precursor Granulocítico-monocítico
Ph	Philadelphia
PIAS	Protein Inhibitors of Activated STAT
PMF	Mielofibrose Primária
PMM	Progenitor Multipotente
PV	Policitemia Vera
SH2	Src homology binding domains 2
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SOCS	Suppressors of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. OBJETIVOS.....	14
1.1.1. Objetivo geral	14
1.1.2. Objetivos específicos	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1. HEMATOPOESE	15
2.2. TROMBOCITOSE.....	15
2.3. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS	17
2.3.1. Policitemia Vera	18
2.3.2. Trombocitose Essencial	18
2.3.3. Mielofibrose Primária	18
2.4. CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA AS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS	19
2.5. MUTAÇÕES NAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS	21
2.6. VIA JAK-STAT	23
2.7. PAPEL DA MUTAÇÃO JAK2V617F NA PATOGÊNESE DAS NMPS	26
3. ARTIGO – FREQUENCY OF JAK2V617F MUTATION IN BRAZILIAN OUTPATIENTS WITH THROMBOCYTOSIS.....	29
REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

A trombocitose corresponde a produção exacerbada de plaquetas pelo organismo e geralmente é um achado acidental em exames de rotina (SCHAFER, 2004). Sua principal causa é secundária a um processo reativo. Entretanto, quando persistente, esta alteração requer avaliação para diagnóstico diferencial para a trombocitose essencial (ET, do inglês, *essential thrombocythemia*) e consequente acompanhamento clínico (TEFFERI; BARBUI, 2015a; TEFFERI; PARDANANI, 2015).

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) Philadelphia negativas (policitemia vera, trombocitose essencial e mielofibrose primária) são desordens das células tronco hematopoiéticas que compartilham mutações e levam a ativação, de forma constitutiva, das etapas fisiológicas de transdução dos sinais celulares responsáveis pela hematopoiese (SPIVAK, 2017). Como consequência, ocorre uma produção excessiva de células sanguíneas diferenciadas e completamente funcionais, podendo ser em uma ou em múltiplas linhagens (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

O acúmulo destas células maduras no sangue periférico, por muito tempo, foi considerado como uma alteração sanguínea benigna, comumente encontrada de forma aleatória em amostras de pacientes muitas vezes assintomáticos. A descoberta, em 2005, da mutação JAK2V617F deu início a uma nova era na compreensão das NMPs Philadelphia negativas (PASSAMONTI; RUMI, 2009).

A partir de então, diversas mutações já foram descritas para estas doenças, resultando na inclusão, a partir de 2008, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), da pesquisa de marcadores clonais como critério diagnóstico para estas patologias. As mutações inclusas nesses critérios ocorrem nos genes JAK2 (JAK2V617F), CALR e MPL, sendo suas frequências em pacientes com trombocitose essencial e mielofibrose primária (PMF, do inglês, *primary myelofibrosis*) correspondentes a 60%, 20 – 25% e 3 – 7%, respectivamente. Aproximadamente 95% dos pacientes com policitemia vera (PV) apresenta a mutação JAK2V617F (TEFFERI; BARBUI, 2015a, 2015b; TEFFERI; PARDANANI, 2015). Uma vez que a expressão das mutações ocorre geralmente de forma única e exclusiva a triagem molecular deve iniciar pela pesquisa da mutação JAK2V617F, seguida pelas mutações nos genes CALR e MPL, conforme resultados negativos forem obtidos. Aproximadamente 10% a 15% dos pacientes com ET ou PMF não expressam nenhuma das três mutações e são citados

como “triplo negativos” (PASSAMONTI; MAFFIOLI, 2016; TEFFERI; BARBUI, 2015a, 2015b; TEFFERI; PARDANANI, 2015).

Com base em sua sensibilidade para a detecção de neoplasias mieloproliferativas, a investigação de mutações no gene JAK2 é recomendada em casos de eritrocitose ou trombocitose sem causa determinada (PASSAMONTI; MAFFIOLI, 2016). A presença isolada da mutação JAK2V617F em pacientes com trombocitose, entretanto, não possibilita seu diagnóstico diferencial, uma vez que esta ocorre nas três NMPs Philadelphia negativas. Como uma única mutação pode resultar em tamanha diversidade fenotípica é um questionamento ainda a ser elucidado. Entretanto, diversas linhas de evidências sugerem que a carga alélica mutante leva a modulação de seu fenótipo clínico (OH; GOTLIB, 2010). Além de compartilhar a mesma mutação, as NMP Philadelphia negativas também se assemelham nas suas características morfológicas, sinais clínicos e sintomas. Isso gera questionamentos quanto ao uso de três diagnósticos distintos para estas neoplasias, sugerindo-se que as mesmas possam ser interpretadas como etapas distintas de uma mesma doença (KOOPMANS; VAN MARION; SCHOUTEN, 2012; MONTE-MÓR; COSTA, 2008).

Os dados relacionados a frequência da mutação JAK2V617F geralmente são referentes a estudos realizados no âmbito hospitalar, quando o paciente, por apresentar sintomas clínicos ou alterações laboratoriais, já está em processo de investigação diagnóstica. Entretanto, quando se trata de saúde, é senso comum que um diagnóstico precoce interfere positivamente no seu prognóstico. Neste contexto se insere este estudo, que avalia a frequência da mutação JAK2V617F em pacientes ambulatoriais e contribuirá gerando informações relevantes relacionadas à sua aplicação como teste de triagem diagnóstica em pacientes com alterações de caráter mieloproliferativo em exames laboratoriais de rotina.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Caracterizar os casos de trombocitose de pacientes ambulatoriais quanto ao seu perfil hematológico e à presença da mutação JAK2V617F.

1.1.2. Objetivos específicos

- Identificar a frequência de casos de trombocitose em pacientes ambulatoriais de um laboratório privado da cidade de Santa Maria, RS, Brasil;
- Identificar a frequência da mutação JAK2V617F nos indivíduos com trombocitose;
- Correlacionar a presença da mutação com o perfil hematológico (contagens de leucócitos, hemácias e plaquetas, e níveis de hematócrito e hemoglobina) e demográfico (sexo e idade) dos indivíduos avaliados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. HEMATOPOESE

A hematopoese é o processo ordenado e contínuo pelo qual células tronco hematopoiéticas (CTH) da medula óssea dão origem às células maduras que irão povoar os sistemas sanguíneo e linfático. Por definição, trata-se de um processo clonal, já que é originado a partir de uma única célula pluripotente (SPIVAK, 2010).

As CTHs são organizadas hierarquicamente em células de longo prazo (CTH-LP) e de curto prazo (CTH-CP) conforme sua capacidade de autorrenovação e repopulação medular. As CTH-LP são células de renovação permanente, proliferando-se ao longo da vida do organismo, podendo se autorrenovar em longo prazo e regenerar todos os tipos de células do sangue. Estas células são mantidas em estado de quiescência na medula óssea. Quando estimuladas, diferenciam-se em CTH-CP, células com capacidade de renovação rápida, porém limitada, responsáveis pela manutenção diária da hematopoese através da diferenciação em células progenitoras multipotentes, que vão dar origem aos progenitores comuns das linhagens mieloide e linfóide (conforme representação esquemática da figura 1). A progênie originária das CTHs progressivamente perde sua capacidade de renovação e gradualmente se torna mais restrita a uma linhagem (DA SILVA JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009; KOOPMANS; VAN MARION; SCHOUTEN, 2012; SPIVAK, 2017).

O nicho hematopoiético na medula óssea auxilia na regulação da capacidade de autorrenovação e diferenciação das CTHs, seja na manutenção do seu estado quiescente ou na proliferação em células progenitoras e diferenciação em células sanguíneas maduras (KOOPMANS; VAN MARION; SCHOUTEN, 2012).

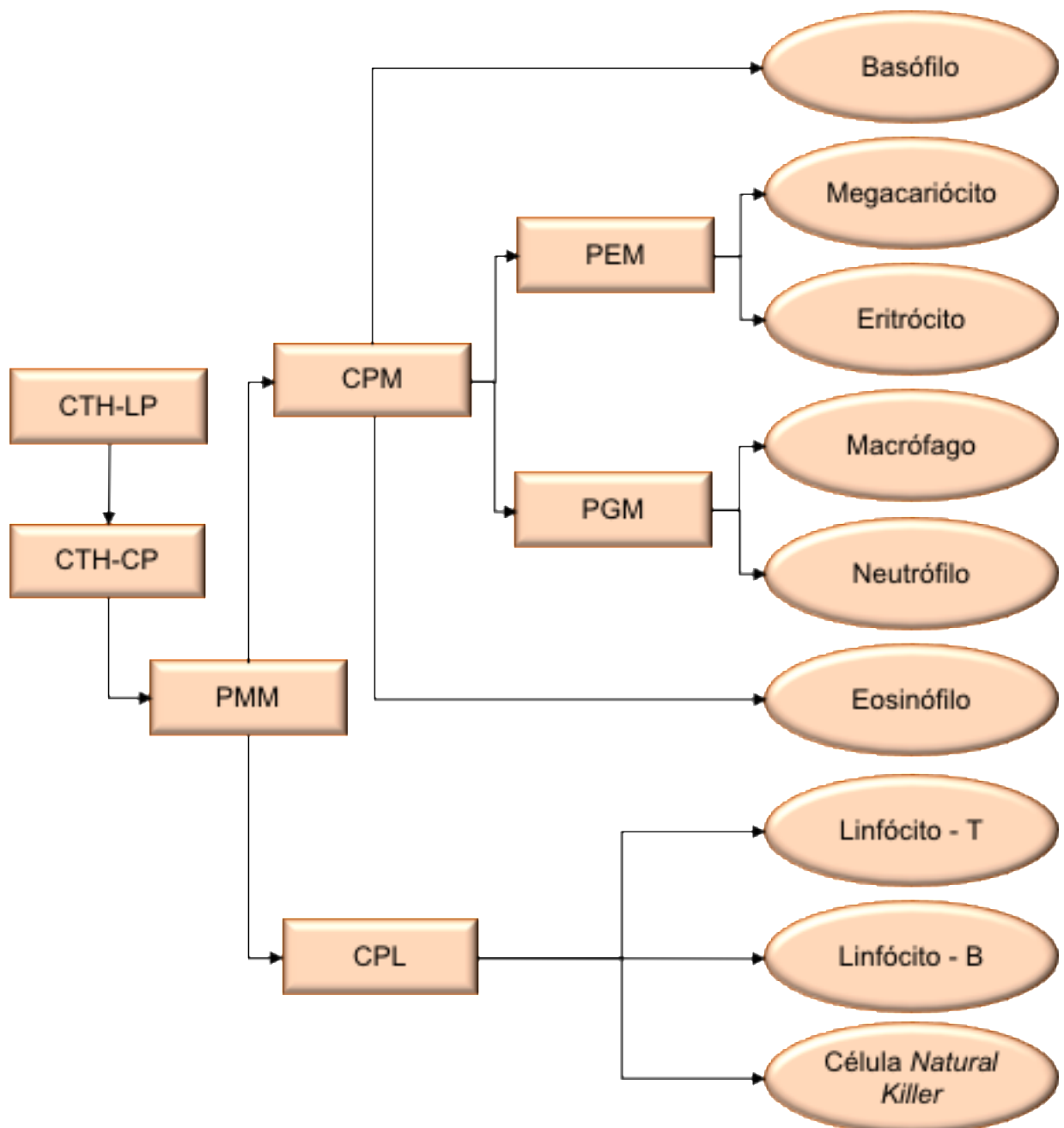
Desordens na proliferação das CTHs podem ocasionar hiperplasia da medula óssea, resultando em acúmulo de células maduras da linhagem eritroide, mieloide e megacariocítica (trombocitose) (SCHAFER, 2001).

2.2. TROMBOCITOSE

A trombocitose corresponde a produção exacerbada de plaquetas pelo organismo, em decorrência de uma variedade de condições clínicas, tanto agudas

crônicas (KRISHNEGOWDA; RAJASHEKARAI AH, 2015). Usualmente, sua descoberta ocorre como um achado acidental em exames de rotina.

Figura 1 - Representação esquemática da diferenciação das células tronco hematopoiéticas



Fonte: Adaptação de Koopmans *et al* (2012).

Legenda: CTH-LP – Célula tronco hematopoiética de longo prazo; CTH-CP – Célula tronco hematopoiética de curto prazo; PMM – Progenitor multipotente; CPM – Célula progenitora mieloide; CPL – célula progenitora linfoide; PEM – Precursor eritroide-megacariocítico; PGM – Precursor granulocítico-monocítico

As principais causas de trombocitose são enquadradas como: trombocitose reativa (ou secundária), decorrente de um processo reativo, cujas causas podem ser: infecções, lesões tissulares, neoplasias malignas, inflamação crônica, hemólise, fármacos, anemia por deficiência de ferro, esplenectomia, etc; e trombocitose não reativa (clonal), na qual se enquadra a trombocitose essencial e outras doenças mieloproliferativas específicas (BITTENCOURT et al., 2010; CHAUFFAILLE, 2010; SCHAFER, 2001).

A trombocitose reativa geralmente é a causa mais frequente de trombocitose na prática clínica. Entretanto, a persistência de contagens aumentadas para plaquetas no sangue periférico requer avaliação para diagnóstico diferencial para ET e consequente acompanhamento clínico (TEFFERI; BARBUI, 2015a; TEFFERI; PARDANANI, 2015).

A ET é classificada como uma neoplasia mieloproliferativa cromossomo Philadelphia (Ph) negativa. Caracteriza-se por hiperproliferação megacariocítica com consequente trombocitose periférica, favorecendo fenômenos trombo-hemorrágicos (TEFFERI; BARBUI, 2015b; TEFFERI; VARDIMAN, 2008; VANNUCCHI; GUGLIELMELLI; TEFFERI, 2009).

2.3. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

As NMPs são doenças clonais das CTHs, caracterizadas pela proliferação clonal das células tronco e progenitoras, causando um aumento de células maduras de uma ou mais linhagens celulares (SAEIDI, 2016; SKODA; DUEK; GRISOUARD, 2015; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017). São doenças com curso de vida longo, geralmente medido em décadas.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu em 2001, com revisões em 2008 e 2016, critérios para classificação de tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfoides. Com isso, a partir de 2008, as NMPs passaram a ser divididas em NMPs clássicas cromossomo Philadelphia positivas (leucemia mieloide crônica) e NMPs clássicas cromossomo Philadelphia negativas, incluindo neste grupo, então, a trombocitose essencial, a policitemia vera e a mielofibrose primária (BARBUI et al., 2018; KOOPMANS; VAN MARION; SCHOUTEN, 2012).

2.3.1. Policitemia Vera

A PV é a NMP mais comum e a única caracterizada pelo aumento da massa eritroide. Este pode estar associado, ou não, a hiperplasia variável nas linhagens megacariocítica e granulocítica (SAEIDI, 2016; SPIVAK, 2018; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017). Esta doença foi inicialmente descrita em 1892 e sua incidência é de 2.5-10/100.000 indivíduos (SPIVAK, 2018). Suas principais complicações são: eritrocitose, prurido, dor ocular, isquemias transientes, trombose arterial e venosa, hemorragia, leucocitose, hiperuricemia e esplenomegalia (SPIVAK, 2018). Em alguns pacientes, pode ocorrer transformação para falência medular, mielofibrose ou leucemia aguda (SPIVAK, 2017).

2.3.2. Trombocitose Essencial

A ET é caracterizada por proliferação de megacariócitos na medula óssea, levando ao aumento isolado e persistente de plaquetas circulantes (ZAGO, 2004; OLIVEIRA, 2010; KRISHNEGOWDA; RAJASHEKARAI AH, 2015). Suas principais complicações são: isquemias transientes, dor ocular, doença de von Willebrand adquirida e, em raros casos, trombose arterial e venosa e transformação para falência medular, mielofibrose ou leucemia aguda. Uma vez que a trombocitose isolada pode ser a principal manifestação na PV e na PMF, o seu diagnóstico é considerado como de exclusão para as demais NMP (SPIVAK, 2017).

2.3.3. Mielofibrose Primária

A PMF é a NMP menos comum, mas a mais agressiva. Caracteriza-se pela presença de fibrose medular e pela expansão mieloproliferativa extramedular, principalmente para o baço (SPIVAK, 2017; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017). Os pacientes podem apresentar aumento nas células CD34+ circulantes, anemia e contagens variáveis de leucócitos e plaquetas circulantes. A doença progride para falência medular, falência de órgãos e transformação para leucemia aguda (SPIVAK, 2017).

Apesar de diferirem clinicamente nas suas apresentações clássicas, o estabelecimento de um diagnóstico diferencial entre as NMPs pode ser muito desafiador. Em muitos casos, observa-se uma continuidade e progressão entre estas doenças, e sua permutabilidade fenotípica permite que a sua avaliação como distúrbios separados seja questionada (SPIVAK, 2018; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017). Os critérios diagnósticos definidos e periodicamente revisados pela OMS visam facilitar e padronizar a detecção destas neoplasias.

2.4. CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA AS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

A partir de 2008, a classificação das NMPs pela OMS passou a ser realizada baseada em três parâmetros: características clínicas, morfologia da medula óssea e dados genéticos (PASSAMONTI; MAFFIOLI, 2016).

As principais alterações realizadas na revisão destes critérios, realizada em 2016, incluem a diminuição dos limites de hemoglobina e hematócrito para o diagnóstico de PV, tanto para homens quanto para mulheres; a inclusão da morfologia da medula óssea como um critério principal para diagnóstico tanto de PV quanto de ET; e a inclusão da mutação no gene CALR como uma das mutações driver para a ET (TEFFERI; BARBUI, 2017).

A tabela 1 compreende os critérios diagnósticos para as neoplasias mieloproliferativas Philadelphia negativas, conforme a última revisão realizada pela OMS em 2016. Os critérios são divididos em principais e secundários, e a correta interpretação destes deve ser realizada conforme as seguintes orientações (BARBUI et al., 2016):

- a) para diagnóstico de PV: paciente deve apresentar os três critérios principais ou os dois primeiros critérios principais associados a um critério secundário;
- b) para diagnóstico de ET: paciente deve apresentar os quatro critérios principais ou os três primeiros critérios principais associados a um critério secundário;
- c) para diagnóstico de PMF pré-fibrótica: paciente deve apresentar os três critérios principais associado a pelo menos um dos critérios secundários;

- d) para diagnóstico de PMF clássica: paciente deve apresentar os três critérios principais associados a pelo menos um dos critérios secundários.

Tabela 1 – Critérios diagnósticos para neoplasias mieloproliferativas Philadelphia negativas revisado pela OMS em 2016

	Policitemia Vera	Trombocitose Essencial	Mielofibrose Primária		
			pre fibrótica	clássica	
Critérios principais	1	Hemoglobina > 16.5 g/dL (homens) Hemoglobina > 16 g/dL (mulheres) ou Hematócrito > 49% (homens) Hematócrito > 48% (mulheres) ou Aumento na massa eritroide	Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9 / L$	Proliferação megacariocítica e atípica, sem fibrose de reticulina > grau 1, acompanhada pelo aumento da celularidade da MO, proliferação granulocítica e eventual diminuição da eritropoese	Proliferação megacariocítica e atípica acompanhada por fibrose tanto de reticulina quanto de colágeno (grau 2 ou 3)
	2	MO com hiper celularidade e mieloproliferação das três linhagens celulares com megacariócitos maduros pleomórficos (diferenças no tamanho)	MO com proliferação megacariocítica de morfologia madura e grande. Ausência de desvio a esquerda na granulopoese neutrofílica ou eritropoese e pequeno aumento nas fibras de reticulina	Não apresentar os critérios diagnósticos para LMC, PV, ET e SMD ou outra neoplasia mielóide	Não apresentar os critérios diagnósticos para LMC, PV, ET e SMD ou outra neoplasia mielóide
	3	Presença da mutação em JAK2	Não apresentar os critérios diagnósticos para LMC, PV, PMF e SMD ou outras neoplasias mielóides	Presença das mutações em JAK2, CALR ou MPL. Na ausência dessas mutações, presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reticulínica reativa medular	Presença das mutações em JAK2, CALR ou MPL ou presença de outro marcador clonal ou ausência de evidência para fibrose medular reacional
	4		Presença das mutações em JAK2, CALR ou MPL		
Critérios secundários	1	Eritropoetina sérica com valores abaixo do valor de referência	Presença de marcadores clonais (como cariótipo anormal) ou ausência de evidência para trombocitose reativa	Presença de uma ou mais das seguintes condições clínicas: * Anemia não atribuída a uma comorbidade * Esplenomegalia palpável * Leucocitose $\geq 11 \times 10^9 / L$ * Dosagem elevada de DHL	Presença de uma ou mais das seguintes condições clínicas: * Anemia não atribuída a uma comorbidade * Esplenomegalia palpável * Leucocitose $\geq 11 \times 10^9 / L$ * Dosagem elevada de DHL * Leucoeritroblastose

Fonte: Adaptação de Barbui *et al* (2016).

Legenda: MO – medula óssea; LMC – leucemia mielóide crônica; PV – Policitemia Vera; PMF – mielofibrose primária; SMD – síndrome mielodisplásica; ET – trombocitose essencial

A análise da morfologia da medula óssea, apesar de questionada, mantém-se como indispensável no diagnóstico diferencial de algumas situações específicas, em que a análise mutacional isolada não é suficiente para diagnóstico. Um exemplo é a presença da mutação JAK2, que, isolada, não possibilita a diferenciação entre policitemia vera, trombocitose essencial ou mielofibrose primária (BARBUI et al., 2015; TEFFERI et al., 2014).

Mesmo com critérios bem definidos, o diagnóstico das NMPs segue sendo bastante desafiador, seja pela similaridade com as formas reativas caracterizadas pelo aumento das contagens de células sanguíneas maduras no sangue periférico, seja pela sobreposição fenotípica entre as próprias NMPs. Os marcadores moleculares buscam facilitar o diagnóstico dessas neoplasias, uma vez que a descoberta de pelo menos uma das mutações *driver* isolada estabelece a presença de uma doença clonal, excluindo a possibilidade de tratar-se de uma doença reacional. Entretanto, as mutações pouco contribuem para o diagnóstico diferencial entre as NMP (VANNUCCHI; GUGLIELMELLI; TEFFERI, 2009).

2.5. MUTAÇÕES NAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Desde 2005, mais de 20 mutações somáticas foram descritas nas neoplasias mieloproliferativas (BARBUI et al., 2015).

A primeira mutação descrita, e também a mais frequente, ocorre no éxon 14 do gene JAK2 (localizado no cromossomo 9p24), pela troca de uma guanina por uma timina, que resulta na proteína funcional mutada, p.Val617Phe, ou seja, uma valina é substituída por uma fenilalanina na posição 617. Esta mutação é conhecida como JAK2V617F e está associada a um fenótipo mieloproliferativo, tendo como consequência a hiperativação da proteína JAK2 nas células mutadas (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017). A frequência mutacional JAK2V617F é estimada em 70% nas NMPs: 95% na PV e 50-60% na ET e na PMF (BARBUI et al., 2015; TEFFERI; PARDANANI, 2015). Subsequente à descoberta da JAK2V617F, outras mutações em JAK2 foram descobertas, como a mutação no éxon 12, por exemplo, com incidência muito inferior (CAZZOLA; KRALOVICS, 2016; PARDANANI et al., 2007). As mutações em JAK2 não estão presentes na população controle

normal e em pacientes com eritrocitose ou trombocitose não clonal (BARBUI et al., 2015).

A segunda mutação mais frequente nas neoplasias mieloproliferativas envolve o gene CALR, localizado no cromossomo 19p13.2., contendo 9 éxons. Este gene codifica uma proteína, a calreticulina, que é uma chaperona ligante de cálcio, de localização luminal no retículo endoplasmático, sendo altamente conservada entre espécies. Todas as mutações deste gene são inserções ou deleções (indels), resultando em uma mutação *frameshift*, que remove a região KDEL do gene e resulta no domínio terminal C com carga positiva (CAZZOLA; KRALOVICS, 2016; NANGALIA et al., 2013; PASSAMONTI; MAFFIOLI, 2016). A mutação mais frequente é uma deleção de 52 pb, que tem início no aminoácido leucina, na posição 367. Como resultado, ocorre uma troca na fase de leitura que resulta em um códon de parada, que ocorre 46 aminoácidos após a deleção. A deleção de 52 pb é chamada de variante tipo 1, encontrada com mais frequência na mielofibrose. A segunda alteração mais frequente no gene CALR é uma inserção de 5 pb (TTGTC) com início no aminoácido lisina, na posição 385. Esta inserção resulta em troca da fase de leitura que resulta num códon de parada a 47 aminoácidos após a inserção e é denominada variante tipo 2, mais comumente observada na trombocitose essencial (NANGALIA et al., 2013; DA SILVA, 2014; PASSAMONTI; MAFFIOLI, 2016). Com exceção de casos isolados, as mutações nesse gene estão ausentes na PV, enquanto sua frequência esteja estimada em 20-25% na ET e na PMF. Portanto, as mutações em CALR parecem ser relativamente específicas a estas doenças (BARBUI et al., 2015; CAZZOLA; KRALOVICS, 2016; PASSAMONTI; MAFFIOLI, 2016).

A avaliação das mutações em CALR foram inseridas na revisão dos critérios da OMS para neoplasias mieloproliferativas de 2016 e deve ser realizada em todos os pacientes negativos para mutação JAK2V617F (PASSAMONTI; MAFFIOLI, 2016).

A terceira mutação envolve o receptor de trombopoietina, MPL, e é a mutação menos frequente nas NMPs, ocorrendo em 3 a 8% dos pacientes com ET ou PMF (BARBUI et al., 2015; SKODA; DUEK; GRISOUARD, 2015; TEFFERI; PARDANANI, 2015). O MPL é um receptor tipo 1 exclusivo de citocinas hematopoiéticas, porque é o único expresso em células tronco hematopoiéticas. As mutações somáticas do MPL ocorrem com mais frequência no éxon 10 e resultam na troca de um triptofano por leucina ou lisina ou, menos frequentemente, por arginina ou alanina no aminoácido 515 (MPLW515L/K ou W515R/A) no domínio da justamembrana. Elas forçam uma

alteração na conformação do receptor, resultando na manutenção deste ativado mesmo na ausência de ligação com trombopoietina (SKODA; DUEK; GRISOUARD, 2015; SPIVAK, 2017).

As mutações em JAK2, CALR e MPL são normalmente exclusivas, embora sua ocorrência concomitante já tenha sido reportada, provavelmente resultante de clones mutantes concorrentes (BARBUI et al., 2015).

Analisadas de forma conjunta, aproximadamente 99% dos pacientes com policitemia vera devem possuir uma das mutações em JAK2, enquanto 80-90% dos pacientes com trombocitose essencial ou mielofibrose primária possuirão uma das três mutações *driver* para neoplasias mieloproliferativas (BARBUI et al., 2015).

Aproximadamente 10% a 15% dos pacientes com ET ou PMF não expressam nenhuma das três mutações e são citados como “triplo negativos” (PASSAMONTI; MAFFIOLI, 2016; TEFFERI; BARBUI, 2015a, 2015b; TEFFERI; PARDANANI, 2015).

Na rotina laboratorial, uma abordagem mais prática para o diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas é requerida e discutida. Esta abordagem envolve a utilização dos marcadores clonais (JAK2V617F, MPL e CALR) para a triagem destas doenças, utilizando a avaliação da medula óssea para diagnóstico diferencial (TEFFERI; BARBUI, 2015a, 2015b). Neste contexto, há diversos autores desenvolvendo algoritmos diagnósticos, cujo ponto de partida passa a ser a pesquisa das mutações. A figura 2 elucida um modelo de algoritmo diagnóstico que inicia com a pesquisa da mutação JAK2V617F no sangue periférico.

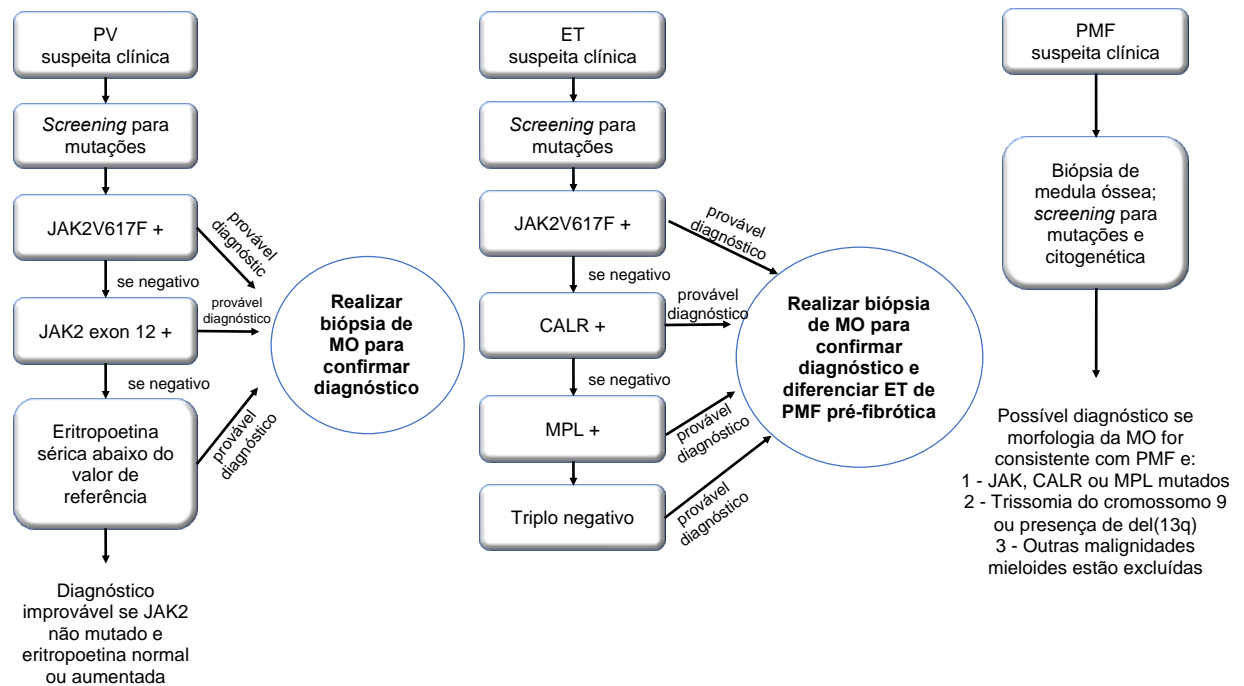
De forma sintetizada, define-se que as mutações *driver* nas NMPs Philadelphia negativas interferem na regulação da proliferação celular. Estudos mostram que o ponto central da sua patogênese ocorra pelo descontrole na ativação da via JAK-STAT (OH; GOTLIB, 2010).

2.6. VIA JAK-STAT

As quinases são importantes na regulação da maioria das etapas celulares, especialmente naquelas envolvidas na transdução de sinais. As proteínas tirosina quinases (PTKs) são um subgrupo dessas proteínas e tem a capacidade de transferir um grupamento fosfato para um resíduo específico de tirosina de seus substratos proteicos. A Janus Kinase é uma família de tirosino quinases que atua fosforilando as proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STATs - do inglês, *signal*

transducer and activator of transcription), que são fatores de transcrição da via JAK-STAT (SAEIDI, 2016).

Figura 2 – Modelo de algoritmo diagnóstico para neoplasias mieloproliferativas



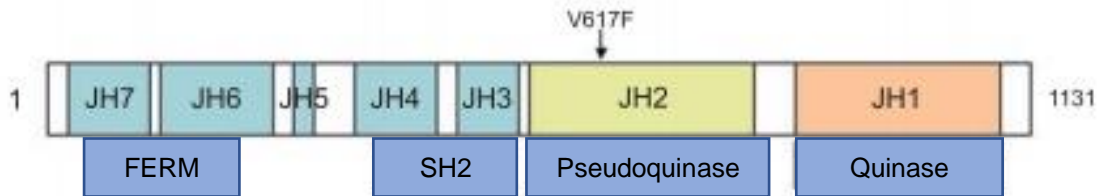
Fonte: Adaptação de Tefferi e Barbui (2017).

A via JAK-STAT é um mecanismo celular que permite a transdução intracelular de sinais através de fatores de crescimento e receptores de citocinas. Este mecanismo regula a proliferação, diferenciação, migração, apoptose e sobrevivência celular. A ativação desta via está ligada a patogênese das NMPs (SAEIDI, 2016).

Todos os membros da família JAK (JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2) compartilham uma sequência semelhante que consiste em sete domínios homólogos (JH1 a 7). Os domínios JH1 e JH2 representam os domínios quinase e pseudoquinase, que são adjacentes. Os domínios JH3 a JH7 correspondem aos domínios SH2 e FERM (GÄBLER; BEHRMANN; HAAN, 2013). A figura 3 traz uma representação da JAK2 e seus domínios homólogos.

O domínio pseudoquinase da JAK2 possui duas funções: inibir o domínio quinase e promover a ativação dependente de citocina (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

Figura 3 -Representação de JAK2 e seus domínios homólogos



Fonte: Adaptação MORGAN; GILLILAND, 2008.

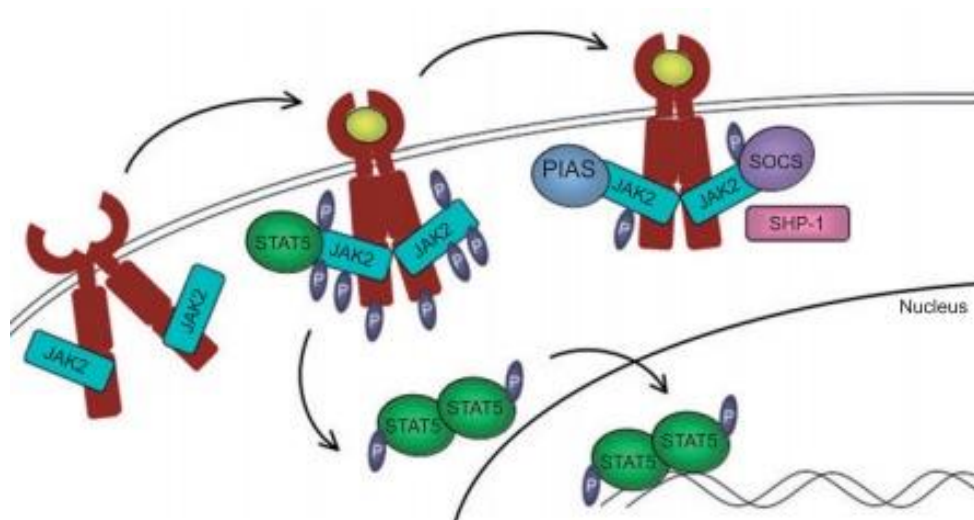
Os domínios FERM e SH2 são responsáveis pela ligação não covalente das JAKs às porções intracelulares dos receptores de citocina. Assim, a família de quinases JAK pode ser considerada a parte catalítica da família de receptores hematopoiéticos de citocina, já que são constitutivamente ligados intracelularmente a estes receptores. As proteínas são mantidas na forma inativa enquanto não houver ligação entre citocina e receptor (GÄBLER; BEHRMANN; HAAN, 2013; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

A ligação de citocinas (como eritropoietina, trombopoietina ou interleucinas) aos receptores induz a alterações na conformação destes e a consequente ativação e fosforilação das JAKs (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017). As proteínas STAT, presentes no citoplasma de forma inativa, constituem os primeiros alvos de fosforilação das JAKs ativadas. As STATs fosforiladas organizam-se em dímeros e translocam-se para o núcleo celular, resultando na expressão gênica, proliferação e diferenciação dos progenitores mieloides (SAEIDI, 2016; SKODA; DUEK; GRISOUARD, 2015). A maior parte das STATs podem ser ativadas pela JAK2, em particular Stat5a, Stat5b, Stat3 e Stat1 (SKODA; DUEK; GRISOUARD, 2015).

A mutação V617F ativa a JAK2 por um mecanismo ainda não totalmente compreendido, mas que inicia com a mudança conformacional no domínio pseudoquinase, causando a perda das suas propriedades auto inibitórias e resultando no aumento da atividade da JAK2 e no consequente crescimento das linhagens celulares independente da ligação das citocinas aos seus receptores (SAEIDI, 2016; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

A regulação da sinalização de JAK (Figura 4) é controlada por diversos mecanismos, com o objetivo de prevenir uma sinalização excessiva ou uma ativação descontrolada, que levaria a desordens autoimunes ou transformações malignas. Os mecanismos para controle da sinalização desencadeada pela citocina incluem a defosforilação direta pelas tirosina fosfatases citossólicas (SHP-1), inibição através da ligação direta na JAK por proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS), e atividade das proteínas inibidoras das STAT ativadas (PIAS) (MORGAN; GILLILAND, 2008).

Figura 4 - Ativação da via JAK-STAT e seus mecanismos de controle



Fonte: MORGAN; GILLILAND, 2008.

Legenda: JAK2 – proteína Janus Kinase 2; STAT5 – proteína transdutora de sinais e ativadora de transcrição 5; PIAS - proteínas inibidoras das STAT ativadas; SOCS – proteínas supressoras da sinalização de citocinas

2.7. PAPEL DA MUTAÇÃO JAK2V617F NA PATOGÊNESE DAS NMPS

Uma questão que ainda está sob esclarecimento referente a mutação JAK2V617F é o fato de uma única mutação resultar em três doenças com diversidade fenotípica. Algumas hipóteses explicam esse fenômeno, como a influência da carga alélica, isto é, a razão entre os genes mutantes e os *wild type* em células hematopoiéticas, na determinação do fenótipo da doença. Estudos mostram que baixos índices de JAK2V617F induzem a um fenótipo mais favorável para ET, com predomínio de trombocitose; enquanto níveis elevados de alelos mutantes levam a

um fenótipo mais favorável para PV. Outra hipótese defende a existência de uma fase pre-JAK2 em que mutações somáticas adicionais ou alelos predisponentes herdados estabeleceriam uma hematopoiese clonal antes da aquisição de JAK2V617F. Assim, as outras mutações determinariam o fenótipo da doença diretamente ou em cooperação com as mutações em JAK2 (OH; GOTLIB, 2010; PASSAMONTI; RUMI, 2009).

A presença da mutação ou sua carga alélica aumentada não parece afetar, entretanto, a sobrevida ou a transformação leucêmica em pacientes com PV ou ET. Em pacientes com trombocitose essencial, a presença da mutação tem sido associada com aumento no risco de trombose arterial e risco diminuído de transformação para mielofibrose. Em pacientes com PV, a carga alélica muito elevada tem sido associada com presença de prurido e transformação fibrótica. Em geral, a presença da mutação está associada a idade mais avançada, níveis mais elevados de hemoglobina, leucocitose e contagem mais baixas de plaquetas (TEFFERI; BARBUI, 2017).

A determinação da carga alélica tem forte relação com a zigose da mutação. A homozigose leva a um aumento na expressão de proteínas mutadas e elimina a competição com as proteínas não mutadas (*wild type*). Sabe-se que aproximadamente 25% dos pacientes com PV são homozigóticos para mutação JAK2V617F e a maioria dos pacientes com ET (93 – 100%) são heterizigóticos ou *wild type*. Assim, acredita-se que a expressão de JAK2V617F em altos níveis levaria a um fenótipo eritroide, quando sua expressão em baixos níveis levaria a um fenótipo megacariocítico (MORGAN; GILLILAND, 2008).

Esta característica reforça, ainda, a hipótese de que PV, ET e PMF poderiam ser interpretadas como etapas diferentes de uma mesma doença, cujo processo daria início pela mutação V617F em heterozigose, que acarretaria ET, que progrediria para PV e MF através de eventos que aumentariam a atividade quinase. Este modelo seria compatível com o padrão geral de evolução clínica, severidade e prevalência das três doenças (MONTE-MÓR; COSTA, 2008).

Na sequência, será apresentado o artigo elaborado a partir dos resultados obtidos neste estudo, intitulado Frequency of JAK2V617F mutation in Brazilian outpatients with thrombocytosis. Este artigo compreende os dados referentes à metodologia, resultados, discussão e conclusão do estudo e será submetido à revista Platelets.

3. ARTIGO – FREQUENCY OF JAK2V617F MUTATION IN BRAZILIAN OUTPATIENTS WITH THROMBOCYTOSIS

Frequency of Janus kinase 2 V617F mutation in Brazilian outpatients with thrombocytosis

Carine Meinerz^{1,2}; Maria do Carmo dos Santos Araújo²; Patrícia Chaves Brites²; Bruno Stefanello Vizzotto³; Marta Maria Medeiros Frescura Duarte⁴; José Edson Paz da Silva¹

¹Laboratório de Hematologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

²Laboratório Central de Análises Clínicas, Hospital Universitário de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

³Laboratório de Biologia Molecular, UFN, Santa Maria, RS, Brasil

⁴Departamento de Saúde, ULBRA, Santa Maria, RS, Brasil

Corresponding author:

Carine Meinerz.

Laboratório de Análises Clínicas – Hospital Universitário

Universidade Federal de Santa Maria

Avenida Roraima, 1000 – prédio 22. Bairro Camobi

CEP: 97105-900 Santa Maria/RS

e-mail: carinemz@yahoo.com.br

Frequency of JAK2V617F mutation in Brazilian outpatients with thrombocytosis

The myeloproliferative neoplasms (MPN) are unique hematopoietic stem-cell disorders, sharing mutations that constitutively activate the physiologic signal-transduction pathways responsible for hematopoiesis, resulting in an increased proliferation of mature hematopoietic cells. The most frequent mutation (*JAK2V617F*) occurs in the Janus kinase gene. We selected 260 outpatients attended in a private clinical laboratory for a blood count exam, within a 9-month period. These patients were older than 18 years and their platelet counts results $\geq 450.000 /\text{mm}^3$. Their blood samples were submitted to DNA extraction and V617F mutation detection by ARMS system. Of the 260 selected samples, 20 (7.7%) were positive for JAK2V617F mutation. The platelet counts and age of patients were significantly higher in the group positive for the mutation (JP), ($p < 0.001$ and 0.039 , respectively). The mutation frequency was significantly higher in patients with age above 65 yo ($p=0.048$). In the JP group, seven patients showed combined erythrocytosis. Of these, three (42.9%) also presented high hemoglobin and hematocrit levels. Leukocytosis was present in 45% of JP patients and three patients presented isolated thrombocytosis. The presence of JAK2V617 in Brazilian outpatients with thrombocytosis was substantial and brings evidence for the use of this mutation as a screening test for MPN.

Keywords: platelets; myeloproliferative neoplasm; ambulatory; screening; mutations.

Introduction

Elevated platelet counts occur commonly as a reactive, or secondary, process. The persistence of thrombocytosis not linked to any underlying disease (primary thrombocytosis) can be ascribed to a clonal (myeloproliferative) disorder (Schafer, 2001).

The myeloproliferative neoplasms (MPN) are unique hematopoietic stem-cell disorders that share mutations that constitutively activate the physiologic signal-transduction pathways responsible for hematopoiesis (Spivak, 2017). They are characterized by excessive production of terminally differentiated blood cells that are fully functional, resulting in single or multilineage blood cell proliferation. Classical MPNs have been classified into 3 entities:

polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF) (Vainchenker & Kralovics, 2017).

In 2016, the World Health Organization (WHO) reviewed the classification of hematological malignancies, especially for MPNs. This classification has three milestones: clinical parameters, bone marrow (BM) morphology, and genetic data, involving three main genes. The first discovered and most common driver mutation consists of a substitution of valine for phenylalanine at position 617 in exon 14 of the Janus kinase (*JAK2*) gene (*JAK2V617F*). Subsequently, other mutations were found in exon 9 of the calreticulin gene (*CALR*) and exon 10 of the thrombopoietin receptor gene (*MPL*). These mutations are generally considered mutually exclusive, and patients with ET and PMF who do not carry any of these mutations (10% to 15%, overall) are defined triple negative (TN) (Passamonti & Maffioli, 2016).

In this study, we aim to determine the frequency of *JAK2V617F* mutation in outpatients with elevated platelet counts.

Methods

Patients

From April 2018 to January 2019, 260 outpatients who attended in a private clinical laboratory for a blood count exam were selected. Complete blood counts were performed on Sysmex XE 2000 using EDTA anticoagulated blood. These patients were older than 18 years and their platelet counts were equal to or greater than 450.000 /mm³. The laboratory provided information about patient's age and sex, as well as the blood count results (platelet, WBC and RBC counts, hemoglobin and hematocrit levels). The samples collected for this initial exam would be normally discarded, but they were intercepted before their final destination for the realization of an additional exam, searching for *JAK2V617F* mutation. This study was approved by the Local Ethics Committee, on April 11, 2018 under the number 2.592.611.

The statistical analysis was performed using SPSS Statistics, version 20 (IBM, USA) software. P-values < 0.05 were considered significant. Numerical variables have been summarized by their median values and categorical variables by number of patients and percentage (%) of each category.

DNA extraction

DNA extraction was performed in whole blood samples, collected in tubes containing EDTA, using the Blood & Tissue DNA Mini Kit (Ludwig Biotec®). The extracted samples were maintained at -20 °C for subsequent analysis.

V617F genotyping by amplification refractory mutation system (ARMS)

The V617F mutation detection assay was performed by conventional PCR based on the ARMS system, as described by Jones et al. (2005). This assay uses two primer pairs to specifically amplify the normal and mutant sequences plus a positive control band in a single reaction. PCR primers were: forward outer (FO), 5'-TCCTCAGAACGTTGATGGCAG-3'; reverse outer (RO), 5'-ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT-3'; forward wild-type-specific (Fwt), 5'-GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATaTG-3'; reverse-mutant-specific (Rmt), 5'-GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAaAA-3'. Amplifications were performed for 30 cycles with 25ng genomic DNA at an annealing temperature of 60°C. Products were revealed on 3% agarose gels and visualized after staining with ethidium bromide

As a result of this reaction, primers FO and RO flanking *JAK2* exon 12 should generate a control 463-bp band in all cases. Primers Fwt and RO generate a 229-bp wild-type (2343G)-specific product and primers FO and Rmt generate a 279-bp mutant (2343T)-specific product (Jones et al., 2005).

Results

There were 65,090 blood count exams collected in the selected period and 652 (1.0%) of them

had elevated platelet count (equal or greater than 450.000/mm³). This data does not exclude duplicated patients.

For the consecutive study, we were able to access data of 260 patients with thrombocytosis within the initial group, excluding duplicated patients. There were 180 (69.2%) female patients and no cases of extreme thrombocytosis (platelet counts above 1000 x10³/mm³).

Of the 260 samples selected for this study, 20 (7.7%) were positive for the JAK2V617F mutation by the ARMS assay. Representative results of PCR products are shown on Figure 1.

The incidence of positivity in women was 7.2% (13 of 180 cases) and in men was 8.7% (7 of 80 cases). There was no significant difference between the incidence of JAK2V617F mutation among gender.

The results were evaluated for the JAK2V617F positive (JP) mutation group versus the JAKV617F negative (JN) mutation group. Red (RBC) and white (WBC) blood cell counts, hemoglobin and hematocrit levels were evaluated according to the reference values (RV) for gender, defined by the clinical laboratory, and categorized as below/within/above range. The results are in Table 1 and Table 2.

The platelet counts and age of patients were significantly higher in the JP group, with $p < 0.001$ and 0.039, respectively.

There was no difference in WBC counts regarding the mutation status. In JP group there were no cases of WBC counts below RV, with 55% of them within RV and 45% above RV. When evaluating the red blood series, there was an even distribution of cases among categories. The less homogeneous distribution was noticed on hemoglobin levels, with 60% of positive mutated cases within RV for this parameter. Patients with RBC counts,

hemoglobin and/or hematocrit levels above the reference value have shown significant positivity for the JAK2V617F mutation ($p < 0.0001$).

Patients were also grouped by age (18-44, 45-64, over 65), as shown in table 1, and the mutation frequency was significantly higher in patients with age above 65 yo ($p = 0.048$). When we evaluate the distribution of JP patients among age groups, 95% (19 patients) were concentrated on the groups above 45 yo. Only one patient (5%) was in the group of younger age. This patient was a 36 yo man.

When analysing the hematological profile of patients in the JP group, seven patients showed combined erythrocytosis. Of these, three (42.9%) also presented hemoglobin and hematocrit levels above RV. Leukocytosis was present in 45% of JP patients. Three patients presented all other parameters within RV, ie, isolated thrombocytosis. Among all patients, these 3 patients represent 1.15% of the studied group.

Discussion

In this study, the frequency of thrombocytosis in an outpatient setting was 1.0%. There are limited studies evaluating the frequency of this blood count alteration, especially in outpatients. But our data is similar to the study performed by Aydogan, Kanbay, Alici & Kosar (2006) that showed a frequency of 1.6% of thrombocytosis among in and outpatients of their service. Another study elaborated by Saadia, Farhan, Butt & Mumtaz (2015), describe an incidence of 4.9% of thrombocytosis in their population, significantly greater than ours. Differences on sampling characteristics may be related to variation on this data.

JAK2V617F is a mutation mainly restricted to classical MPNs and is the most frequent mutation found in the clonal hematopoiesis associated with aging (Skoda, Duek & Grisouard, 2015; Vainchenker & Kralovics, 2017). Although it does not differentiate one type of MPN from other, it is a diagnosis criterion for this condition. Its frequency is around 95%

in PV and between 50% and 60% in ET and PMF (Skoda, Duek & Grisouard, 2015; Spivak, 2017)

In this study we evaluate the presence of the most frequent mutation as an indicator of a probable hematologic malignancy.

There are limited studies evaluating occurrence and etiology of thrombocytosis, especially among outpatients only. Two studies performed with in and outpatients and before JAK2V617F mutation was discovered defined an occurrence of 14% (Buss, Cashell, O'Connor, Richards & Case, 1994) and 12.3% (Griesshammer, Bangerter, Sauer, Wennauer, Bergmann & Heimpel, 1999) of primary thrombocytosis, using only non-molecular diagnostic criteria for that. Aydogan, Kanbay, Alici & Kosar (2006) described the occurrence of primary thrombocytosis in 3.3% of the evaluated patients; while Saadia, Farhan, Butt & Mumtaz (2015) defined an occurrence of 0.6% of clonal thrombocytosis. The criteria used to determine the origin of thrombocytosis in both studies are not reported, but the mutation for the JAK2 gene was discovered in 2005. In 2019, Hsieh et al. evaluated the frequency of new cases of hematological malignancies (including MPN) in outpatients with extreme thrombocytosis ($> 1.000.000 / \text{mm}^3$), obtaining a frequency of 15.6%. The criteria used for this determination are also not described in the study, but the authors mentioned that it was conducted at a major academic center known for its work with hematological malignancies and this could influence the achievement of such elevated frequency. The variety of data found in the literature regarding the presence of clonal thrombocytosis occurs for several reasons, being the difference on the studies designs an important factor. In the case of our study, we have the limitation of evaluating only the presence of the V617F mutation which, even though is the more frequent mutation, does not allow a determination of the real frequency of MPN in the studied population. For that, additional data would be required.

Tefferi & Barbui (2017) developed an algorithm for the diagnosis of myeloproliferative neoplasm that begins with peripheral blood mutation screening for JAK2V617F. Our frequency data (7.7%) corroborates with the suggested algorithm, as it proves that there are a considerable number of theoretically asymptomatic patients positive for this mutation.

This study showed an equal distribution of JAK2V617F among gender and a higher incidence of the mutation in patients with age superior of 45 yo. According to Spivak, 2017, MPN are uncommon before the age of 50 years. After the age of 60 years its incidence increases exponentially in association with the increased incidence of several mutations, including JAK2V617F.

The results analysis, comparing JN and JP groups shows that patients of the JP group presented age and platelet counts significantly higher than patients of the JN group. There was no difference on the incidence by gender. In 2018, Yokus & Gedik evaluated the frequency of JAK2 mutation in patients investigating essential thrombocytosis. In their study, they found that patients with the mutation had significantly higher age, but there was no statistical difference for the platelet counts and gender stratification.

Although there is a reduced number of patients in the JP group (20) of our study, our data showed similar results of a study performed in another center in Brazil. Porto-Soares, M. A., De Oliveira, R. D., Cortopassi, G. M., Machado-Neto, J. A., Palma, L. C. & Figueiredo-Pontes, L. L. de. (2019) evaluated the molecular profile of patients with MPN in Brazil, including the demographic data and hematological profile of the studied group. In this study, patients with MPN (PV, ET or PMF, with different mutational status) showed characteristics and hematological profiles that can be compared with the JP group of our study. Despite the mean age of our study been higher than theirs (65.9 versus 61 yo), other data were very similar, such as the frequency of the disorder in male patients (35% on our study, versus

39.3% on theirs); hemoglobin mean levels (13.8 versus 14.5 g/dL); hematocrit mean levels (42.8% versus 43%) and WBC counts means ($9.55 \times 10^9/\text{mm}^3$ versus $10.1 \times 10^9/\text{mm}^3$).

Conclusion

This study demonstrated an occurrence of 1% of thrombocytosis in Brazilian outpatients, of which 7.7% are positive for JAK2V617 mutation. This data provides arguments for developing additional studies comprehending a more expressive number of patients, the search of other clonal markers and correlation with other laboratory tests and specific clinical findings. It also brings evidence for the utilization of clonal markers as laboratory screening for MPN in suspected cases, before performing any other invasive procedure.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Aydogan, T., Kanbay, M., Alici, O. & Kosar, A. (2006). Incidence and etiology of thrombocytosis in an adult Turkish population. *Platelets*, 17(5), 328–331.
- Buss, D.H., Cashell, A.W., O'Connor, M.L., Richards, F. & Case, L.D. (1994). Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: A study of 280 cases. *The American Journal of Medicine*, 96(3), 247–253.
- Griesshammer, M., Bangerter, M., Sauer, T., Wennauer, R., Bergmann, L. & Heimpel, H. (1999). Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: Analysis of 732 patients with an elevated platelet count. *Journal of Internal Medicine*, 245(3), 295–300.
- Hsieh, R. W., Ravindran, A., Hook, C. C., Begna, K. H., Ashrani, A. A., Pruthi, R. K., ... , Al-Go, R. S. (2019). Etiologies of Extreme Thrombocytosis: A Contemporary Series. *Mayo Clinic*

Proceedings, 94(8), 1542–1550.

Jones, A. V., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, C., Zhang, L., ... Cross, N.C.P. (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106(6), 2162–2168.

Passamonti, F. & Maffioli, M. (2016) Update from the latest WHO classification of MPNs: A user's manual. *Hematology*, 2016(1), 534–542.

Porto-Soares, M. A., De Oliveira, R. D., Cortopassi, G. M., Machado-Neto, J. A., Palma, L. C. & Figueiredo-Pontes, L. L. de. (2019). Clinical and molecular profile of a Brazilian cohort of patients with classical BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. Advanced online publication. doi: 10.1016/j.htct.2019.07.008.

Saadia, A., Farhan, S., Butt, T. A. L. I. & Mumtaz, A. (2015). Thrombocytosis : Frequency and Etiologic Analysis. *Pakistan Journal of Medical Analysis*, 9(2), 681–684.

Schafer, A. I. (2001) Thrombocytosis and thrombocythemia. *Blood Reviews*, 15(4), 159–166.

Skoda, R. C., Duek, A. & Grisouard, J. (2015) Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Experimental Hematology*, 43(8), 599–608.

Spivak, J. L. (2017). Myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 376(22), 2168–2181.

Tefferi, A. & Barbui, T. (2017). Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 92 (1), 94–108.

Vainchenker, W. & Kralovics, R. (2017). Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 129(6), 667–679.

Yokus, O, & Gedik, H. (2018). Jak-2 mutation frequency in patients with thrombocytosis. *Caspian J Intern Med*, 9(2), 189-193.

Figure 1. ARMS assay to detect JAK2V617F mutation. Representative results: normal genotype: tracks 1 to 4, 6, 7, 9 and 10; negative control (mix without DNA): track 11; heterozygous mutation: track 5; homozygous mutation: track 8; DNA ladder (100 pb): track M.

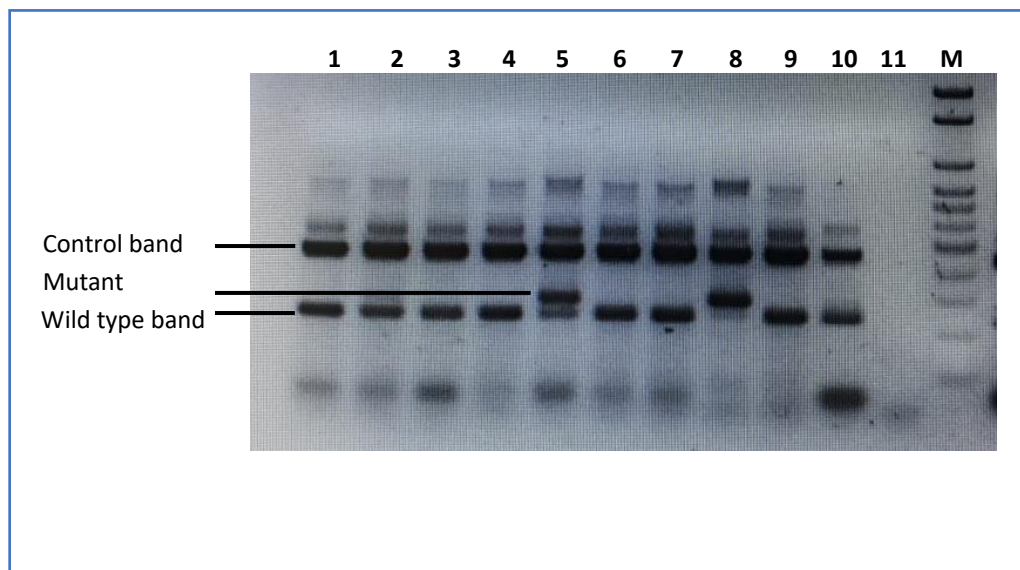


Table 1. Demographic and laboratory features of patients with thrombocytosis.

Parameters		JAK (-) n = 240	JAK (+) n = 20	P
Platelet count ($\times 10^3/\text{mm}^3$)(median)		499.5 (450-924)	563.5 (450-936)	< 0.001
Age (years)(median)		58 (19-95)	68.5 (36-85)	0.039
Age groups	18 - 44 yo (69)	68 (28.3%)	1 (5%)	0.048
	45 - 64 yo (88)	81 (33.8%)	7 (35%)	
	> 65 yo (103)	91 (37.9%)	12 (60%)	
Gender	female (180)	167 (69.6%)	13 (65%)	0.670
	male (80)	73 (30.4%)	7 (35%)	
WBC - n (%)	below RV	10 (4.2%)	0 (0%)	0.513
	within RV	144 (60%)	11 (55%)	
	above RV	86 (35.8%)	9 (45%)	
RBC - n (%)	below RV	99 (41.3%)	7 (35%)	< 0.0001
	within RV	127 (52.9%)	6 (30%)	
	above RV	14 (5.8%)	7 (35%)	
Hemoglobin - n (%)	below RV	134 (55.8%)	4 (20%)	< 0.0001
	within RV	105 (43.8%)	12 (60%)	
	above RV	1 (0.4%)	4 (20%)	
Hematocrit - n (%)	below RV	123 (51.2%)	5 (25%)	< 0.0001
	within RV	116 (48.3%)	9 (45%)	
	above RV	1 (0.4%)	6 (30%)	

WBC – white blood cell counts; RBC – red blood cell counts; RV – reference value

Table 2. Hematological profiles of JP group (patients positive for JAK2V617F mutation).

Patient number	Age	Gender	Platelets (/mm ³)	WBC (/mm ³)	RV	RBC (millions/mm ³)	RV	Hemoglobin (g/dL)	RV	Hematocrite (%)	RV
1	53	F	572.000	8.720	within	4,07	within	13,8	within	40,8	within
2	81	M	555.000	6.770	within	4,99	within	16,10	within	46,80	within
3	49	F	525.000	4.950	within	6,43	above	12,2	within	42,7	within
4	83	F	506.000	7.290	within	6,95	above	15,4	above	50,5	above
5	70	M	450.000	6.140	within	3,64	below	13,70	within	41,30	within
6	49	F	475.000	7.180	within	3,45	below	13,8	within	39,9	within
7	85	F	694.000	12.340	above	4,76	within	13,2	within	41,3	within
8	81	M	603.000	9.750	within	4,19	below	11,90	below	35,60	below
9	79	F	637.000	10.610	above	2,56	below	10,6	below	33,4	below
10	54	F	480.000	13.840	above	6,85	above	14,7	within	50,3	above
11	83	F	451.000	16.010	above	7,69	above	14,6	within	50,1	above
12	53	F	514.000	5.240	within	4,57	within	15,9	above	46,3	above
13	65	F	504.000	8.490	within	4,84	above	14,6	within	44,5	within
14	70	F	808.000	10.430	above	5,25	above	15,9	above	48,4	above
15	67	M	543.000	8.800	within	5,15	within	13,50	within	42,50	within
16	36	M	710.000	12.090	above	4,54	within	15,00	within	46,10	within
17	55	F	690.000	5.570	within	3,1	below	12,4	within	35,6	below
18	73	M	585.000	10.180	above	3,89	below	11,00	below	36,10	below
19	71	M	729.000	15.780	above	3,07	below	12,30	below	37,90	below
20	62	F	936.000	10.870	above	5,05	above	15,1	above	46,8	above
Mean	66	-	598.350	9.552,50	-	4,76	-	13,79	-	42,85	-
SD	14,1	-	128808,8	3287,1	-	1,4	-	1,6	-	5,3	-

REFERÊNCIAS

- BARBUI, T. et al. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. **Blood Cancer Journal**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. e337-8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2015.64>>
- BARBUI, T. et al. The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances. **Blood Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 453–459, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2016.06.001>>
- BARBUI, T. et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. **Blood cancer journal**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 15, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0054-y>>
- CAZZOLA, M.; KRALOVICS, R. From Janus kinase 2 to calreticulin : the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, [s. l.], v. 123, n. 24, p. 3714–3720, 2016.
- CHAUFFAILLE, M. de L. L. F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 308–316, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000400008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>
- DA SILVA JUNIOR, F. C.; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. Células-tronco hematopoéticas: Utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 31, n. SUPPL. 1, p. 53–58, 2009.
- GÄBLER, K.; BEHRMANN, I.; HAAN, C. JAK2 mutants (e.g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms. **Jak-Stat**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. e25025, 2013.
- KOOPMANS, S. M.; VAN MARION, A. M. W.; SCHOUTEN, H. C. Myeloproliferative neoplasia: A review of clinical criteria and treatment. **Netherlands Journal of Medicine**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 159–167, 2012.
- KRISHNEGOWDA, M.; RAJASHEKARAI AH, V. Platelet disorders: An overview. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 479–491, 2015.
- MONTE-MÓR, B. C. R.; COSTA, F. F. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 30, n. 3, 2008.
- MORGAN, K. J.; GILLILAND, D. G. A Role for JAK2 Mutations in Myeloproliferative Diseases. **Annual Review of Medicine**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 213–222, 2008.
- NANGALIA, J. et al. Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2*. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 369, n. 25, p. 2391–2405, 2013. Disponível em:

<<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1312542>>

OH, S. T.; GOTLIB, J. JAK2 V617F and beyond: Role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Expert Review of Hematology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 323–337, 2010.

PARDANANI, A. et al. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. **Leukemia**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 1960–1963, 2007.

PASSAMONTI, F.; MAFFIOLI, M. Update from the latest WHO classification of MPNs: A user's manual. **Hematology**, [s. l.], v. 2016, n. 1, p. 534–542, 2016.

PASSAMONTI, F.; RUMI, E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. **Haematologica**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 7–10, 2009.

SAEIDI, K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 98, p. 375–389, 2016.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.004>>

SCHAFER, A. I. Thrombocytosis and thrombocythemia. **Blood Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 159–166, 2001.

SKODA, R. C.; DUEK, A.; GRISOUARD, J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 599–608, 2015.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2015.06.007>>

SPIVAK, J. L. Myeloproliferative neoplasms. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 376, n. 22, p. 2168–2181, 2017.

SPIVAK, J. L. Polycythemia Vera. **Current Treatment Options in Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 2, 2018.

TEFFERI, A. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. **Blood**, [s. l.], v. 124, n. 16, p. 2507–2513, 2014.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera: Focus on Clinical Practice. **Mayo Clinic Proceedings**, [s. l.], v. 90, n. 9, p. 1283–1293, 2015. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.05.014>>

TEFFERI, A.; BARBUI, T. CME Information : Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **AM. J. Hematol.**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 163–173, 2015. b.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 94–108, 2017.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative neoplasms: A contemporary

review. **JAMA Oncology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 97–105, 2015.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 14–22, 2008.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, [s. l.], v. 129, n. 6, p. 667–679, 2017.

VANNUCCHI, A. M.; GUGLIELMELLI, P.; TEFFERI, A. Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms. **Hematology**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 171–191, 2009.