

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS**  
**À FARMÁCIA**

**SARAH PAGLIARINI E SILVA**

**Estudo da frequência dos haplótipos do gene JAK2 em pacientes portadores  
de neoplasias mieloproliferativas crônicas**

**Maringá**

**2011**

SARAH PAGLIARINI E SILVA

Estudo da frequência dos haplótipos do gene JAK2 em pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas crônicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jeane Eliete Laguila Visentainer

Co-Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Sell

Maringá

2011

## FOLHA DE APROVAÇÃO

SARAH PAGLIARINI E SILVA

### Estudo da frequência dos haplótipos do gene JAK2 em pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas crônicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

#### COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jeane Eliete Laguila Visentainer

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Takahashi Higa

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Eliana Valéria Patussi

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Valeria Buccheri

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Maria Cláudia Santos da Silva

Universidade Federal de Santa Catarina

Aprovada em: 20 de dezembro de 2011.

Local de defesa: Sala 102, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que o tornaram possível.

## AGRADECIMENTO

A minha família, pelo grande apoio durante a realização deste trabalho. Aos meus pais, Francisco e Maria Suely, que participaram ativamente, com muito carinho, em diferentes etapas deste projeto. E ao meu marido, Fabiano, pela compreensão e admiração pelo esforço empreendido para que isto fosse possível.

Aos funcionários e amigos do Hemocentro que muito gentilmente colaboraram para a coleta das amostras e a sua diretora, Dra. Silvia Maria Tintori, que prontamente autorizou e apoiou a realização deste projeto.

Às enfermeiras Mari Ellen e Elaine pelo empenho singular em convidar pacientes para este trabalho e coletar suas amostras .

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética, pelo apoio e paciência.

Às amigas Elizangela e Bruna, que foram fundamentais para meu aprendizado técnico, agradeço enormemente por disponibilizarem seu tempo e atenção para a realização deste trabalho.

Aos pacientes, pela enorme disposição em participar do estudo, tão gentilmente cedendo amostras e, em especial aos meus pacientes, pela fé e respeito ao meu trabalho. Vocês são o motivo!

A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Ana Maria, pela disponibilidade, paciência e pelo fundamental apoio técnico e científico.

E a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Jeane, agradeço a oportunidade, a confiança e a coragem em permitir que novos caminhos fossem abertos.

## EPÍGRAFE

Como costuma lembrar a Prof<sup>ta</sup> Jeane:

"Nobody made a greater mistake than he who did nothing because he could do only a little. All that is necessary for the triumph of evil is for good men to do nothing."

(Edmund Burke)

## Estudo da frequência dos haplótipos do gene JAK2 em pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas crônicas

### RESUMO

O haplótipo 46/1 do gene JAK2 foi recentemente descrito como um fator de risco importante para o desenvolvimento da neoplasias mieloproliferativas crônicas, tanto positivas como negativas para a mutação JAK2 V617F. O alelo G é caracterizado pelo polimorfismo de um único nucleotídeo, chamado JAK2 rs10974944, fazendo parte do haplótipo 46/1 do gene JAK2. O objetivo deste estudo foi verificar a associação entre a presença do haplótipo 46/1 do gene JAK2, representado pelo alelo G, e o desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas em nossa população. Sangue e amostras provenientes de swabs oral foram obtidos de 56 pacientes, atendidos em dois hospitais regionais, previamente diagnosticados como tendo neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas. Amostras de sangue de 90 doadores de sangue, provenientes do hemocentro local, foram utilizados como controle. Após a extração de DNA da amostra, a presença do alelo G foi pesquisada por genotipagem através da técnica de PCR-RFLP nas amostras provenientes de pacientes e controles. A frequência do alelo G foi significativamente maior em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas ( $p=0.0001$ ; OR=2.674; 95% CI=1.630-4.385) quando comparado aos controles. Em concordância com os dados previamente descritos na literatura, a presença do haplótipo 46/1 do gene JAK2, representada pela presença do alelo G, mostrou-se como um importante fator predisponente ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas crônicas em nossa população.

**Palavras-chaves:** Neoplasias mieloproliferativas. Mutação JAK2 V617F. Alelo G.

## Evaluation of the JAK2 gene haplotype frequency in patients with chronic myeloproliferative neoplasm

### ***ABSTRACT***

The JAK2 46/1 haplotype has recently been described as a major contributor factor to the development of myeloproliferative neoplasm either positive or negative for the JAK2 V617F mutation. The G allele of a specific single nucleotide polymorphism, called JAK2 rs10974944, is part of the JAK2 46/1 haplotype. The aim of this study is to verify the association between the presence of the JAK2 46/1 haplotype, represented by the G allele, and the development of BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms in our population. Blood and oral mucosa swabs samples were obtained from 56 patients, from two local Brazilian hospitals, previously diagnosed as having BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms. Blood samples from 90 local blood donors were used as controls. The presence of the G allele was accessed using a PCR-RFLP assay after DNA sample extraction. The presence of the G allele was strongly associated with the presence of BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms ( $p=0.0001$ ;  $OR=2.674$ ;  $95\% CI=1.630-4.385$ ) in the studied population. In agreement with previous reports, the JAK2 46/1 haplotype, represented here by the presence of the G allele, is an important predisposing factor in the oncogenetic development of these neoplasms in our population.

***Keywords:*** Myeloproliferative disorders. JAK2 V617F mutation. G allele.



Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica: *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. Disponível em: <http://www.sbh.com.br/biblioteca/Instrucoes-autores-2009.pdf>.

## SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I.....	12
a. Introdução.....	12
b. Objetivos.....	19
c. Referências.....	21
2. CAPÍTULO II.....	23
a. Evaluation of the JAK2 46/1 haplotype association with the presence of chronic myeloproliferative neoplasms in Brazilian population.....	24
3. CAPÍTULO III.....	40
a. Conclusões.....	40
b. Perspectivas Futuras.....	41

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DO GENE JAK2 EM PACIENTES  
PORTADORES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS**

## CAPÍTULO I

### Introdução

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPc) são doenças caracterizadas pela proliferação clonal de células provenientes de um precursor comum (célula tronco hematopoética) levando ao acúmulo de células de linhagem mielóide maduras. Tais doenças têm características próprias possibilitando a classificação, conforme proposto pela Organização Mundial de Saúde<sup>(1)</sup>, em entidades distintas, sendo as principais: leucemia mielóide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose idiopática (MF).

Apesar de apresentarem características próprias, frequentemente existe sobreposição entre as NMPc, muitas vezes dificultando sua classificação exata. As semelhanças entre estas doenças foram observadas por Dameshek<sup>(2)</sup> há mais de 50 anos, que sugeriu um estímulo único como sendo o desencadeador da proliferação das células mielóides na medula óssea. Tal estímulo comum seria o responsável pela interrelação entre as diferentes NMPc. Dameshek acreditava que o fator desencadeante era forte o suficiente para ativar novamente a hematopoese em sítios embrionários como o baço e o fígado.

A descoberta do gene de fusão BCR-ABL produto da t(9;22), o cromossomo Philadelphia, gerando um proteína com atividade de tirosino-quinase constitutivamente ativada trouxe novas possibilidades à compreensão da origem das NMPc<sup>(3)</sup>. Outras várias translocações gênicas foram descritas em neoplasias mieloproliferativas agudas e crônicas apontando para as vias de sinalização e proliferação celular como os frequentes alvos implicados na oncogênese.

Observou-se que as células de linhagem hematopoéticas provenientes de pacientes com NMPc cresciam, em meios de cultura celular, independentes da presença de fatores estimulatórios como a eritropoetina <sup>(4,5,6)</sup>. Estudos adicionais demonstraram aumento da expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização intracelular ativada por receptores tirosino-quinases como os fatores de transcrição citoplasmáticos denominados STATs (*Signal Transducers and Activation of Transcription*) <sup>(7,8,9)</sup>. As atenções se voltaram, então, para receptores e proteínas com atividade tirosino-quinases como potenciais agentes envolvidos na patogênese deste grupo de doenças.

A família de tirosino-quinases JAK ganhou importância nas últimas décadas após a caracterização de sua função como proteínas citoplasmáticas de sinalização intracelular compartilhadas por diferentes receptores de citocinas e fatores de crescimento. Tais vias de sinalização são essenciais aos processos de multiplicação, diferenciação, sobrevivência e morte celular.

No início da década de 90, quando foram inicialmente descritas, as proteínas da família JAK receberam este nome como um acrônimo do termo inglês *Just Another Kinase*. Quando estudos adicionais concluíram que a estrutura das proteínas desta família diferia das proteínas com atividade tirosino-quinase previamente descritas, pois apresentavam um domínio adicional pseudo-quinase, optou-se por mudar a denominação para *Janus Kinases*. A sigla JAK foi mantida utilizando como referência sua característica molecular dimérica, com dois domínios quinases (um tirosino-quinase, JH1, e outro pseudo-quinase, JH2), em alusão à figura mítica greco-romana de Janus, deus de duas faces idênticas, guardião dos portões <sup>(14)</sup>.

As proteínas da família JAK, principalmente JAK1, JAK2 e TYK2 são expressas em diferentes linhagens celulares. Com a melhor caracterização destas proteínas, notou-se que a atividade catalítica responsável pela fosforilação dos resíduos de tirosina de diferentes receptores celulares estava restrita ao domínio tirosino-quinase (JH1). O domínio pseudo-quinase (JH2) não apresenta atividade catalítica agindo como seu modulador. Ambos domínios estão localizados na porção carboxi-terminal da proteína. A porção amino-terminal tem a função de interagir com os diferentes receptores celulares.<sup>(10)</sup>

Citocinas e fatores de crescimento utilizam as proteínas da família JAK quinase para a propagação de sinais intracelulares (Tabela 1). Nas células não estimuladas, tais proteínas encontram-se em seu estado inativo. Quando ocorre ligação de uma citocina ao seu receptor,

por exemplo, este estímulo serve para recrutar as JAK quinases para próximo ao receptor e induzir sua fosforilação e, conseqüentemente, a fosforilação de outras proteínas da cascata de sinalização intracelular. Entre as proteínas fosforiladas, é crucial a ativação de uma família de fatores de transcrição citoplasmáticos denominados STATs (*Signal Transducers and Activation of Transcription*). Após sua ativação, os STATs se translocam para dentro do núcleo celular, ligando-se a regiões promotoras específicas de genes alvo e induzindo sua transcrição. Outras proteínas como, por exemplo, MAP quinase e PI3 quinases, também são ativadas. A combinação da ação destas diferentes vias de sinalização intracelular resulta no efeito final da ativação do receptor pelo seu respectivo fator de crescimento ou citocina.<sup>(1,14)</sup>

Tabela 1. JAK quinases ativadas nas vias de sinalização intracelular estimuladas pelos fatores de crescimento e citocinas.

JAK quinase	Fatores de Crescimento e Citocinas
JAK 1	IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-13, IL-15, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , EGF, PDGF
JAK 2	IL-2, IL-2, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, IFN $\gamma$ , Epo, Tpo, G-CSF, GH, PRL, Leptina, GM-CSF, Insulina
JAK 3	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, G-CSF
TYK 2	IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , Tpo

Somente em 2005, cinqüenta anos após as primeiras especulações de uma etiologia comum, foi descrita uma mutação comum às mieloproliferações crônicas BCR-ABL negativas. Vários grupos encontraram, em freqüências semelhantes, a mutação de um único nucleotídeo (single nucleotide polymorphism – SNP) no gene codificador da tirosino-quinase JAK2. O gene *JAK2* foi localizado no cromossomo 9 (9p24)<sup>(11,12,13,14)</sup>.

A mutação descrita ocorre na posição 1849 do gene *JAK2*, onde um resíduo de guanina é substituído por timina, causando a substituição de valina por fenilalanina (V617F), no domínio pseudo-quinase da proteína produzida. Ocorre alteração da atividade moduladora do domínio pseudo-quinase, com ativação constitutiva da atividade tirosino-quinase da proteína e independência do estímulo extracelular (exemplo: ligação da eritropoetina ao seu

receptor). Tal mutação foi observada em aproximadamente 95% dos casos de policitemia vera e 50% dos casos de trombocitemia essencial e mielofibrose.

A avaliação de células de linhagem linfóide (linfócitos T) e células da mucosa oral de pacientes, além de células sanguíneas provenientes de familiares e indivíduos controles saudáveis não evidenciou a mutação *JAK2 V617F*, mostrando que esta é uma mutação adquirida.<sup>(11,12)</sup>

O fato da mutação V617F do gene *JAK2* não ser encontrada em indivíduos normais possibilitou a simplificação da investigação diagnóstica em pacientes com quadros clínicos sugestivos de NMPc. Em 2008, a Organização Mundial de Saúde acrescentou a mutação entre os critérios diagnósticos das NMPc (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios diagnósticos das principais neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas <sup>(1)</sup>

NMPc	Policitemia Vera	Mielofibrose	Trombocitemia Essencial
<b>Critérios Maiores</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Hemoglobina &gt; 18,5 g/dL em homens e &gt; 16,5 g/dL em mulheres ou outras evidências de aumento do volume eritrocitário</li> <li><b>Presença da mutação JAK2 V617F</b>, ou outra mutação similar</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Presença de proliferação de megacariócitos com atipias associada a fibrose medular ou, na ausência de fibrose medular, hiper celularidade medular com aumento da série granulocítica e redução da série eritróide</li> <li>Ausência de critérios diagnósticos para PV, LMC, SMD ou outras neoplasias mielóides</li> <li><b>Demonstração da mutação JAK2 V617F</b> ou outro marcador clonal (na ausência destes, excluir causas secundárias de fibrose medular)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Contagem plaquetária &gt; 450x10<sup>9</sup>/L, mantida</li> <li>Biópsia de medula óssea com hiper celularidade da linhagem megacariocítica, sem aumento significativo da granulopose ou eritropose</li> <li>Ausência de critérios diagnósticos para PV, MF, LMC, SMD ou outras neoplasias mielóides</li> <li><b>Demonstração da mutação JAK2 V617F</b> ou outro marcador clonal (na ausência destes, excluir causas de trombocitose reacional)</li> </ol>
<b>Critérios Menores</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Biópsia de medula óssea com hiper celularidade (panmielose)</li> <li>Níveis séricos de eritropoetina diminuídos</li> <li>Formação de colônias eritróides endógenas <i>in vitro</i></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Leucoeritroblastose</li> <li>Aumento da lactato desidrogenase sérica</li> <li>Anemia</li> <li>Esplenomegalia</li> </ol>	
<b>Diagnóstico</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Presença de ambos critérios maiores e um critério menor</li> <li>Presença do primeiro critério maior e dois critérios menores</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Presença dos três critérios maiores e dois critérios menores</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Presença dos quatro critérios maiores</li> </ol>

PV: policitemia vera, LMC: leucemia mielóide crônica, SMD: síndrome mielodisplásica, MF: mielofibrose.

Desde as descrições iniciais da mutação *JAK2 V617F*, notava-se que, as células neoplásicas podiam ser heterozigotas ou homozigotas para a mutação. Observou-se que, nos casos homozigotos, a mutação ocorre preferencialmente em um dos alelos do gene *JAK2* <sup>(11)</sup>. Observou-se que a perda da heterozigosidade dá-se por recombinação mitótica com consequente dissomia uniparental favorecendo o gene mutado em relação ao gene selvagem.



A homoziguidade para a mutação *JAK2 V617F* parece oferecer vantagem proliferativa adicional, sendo principalmente encontrada nos casos de PV e MF, sendo rara na TE.

A descoberta de uma mutação comum a diferentes NMPc suscitou o interesse em pesquisar casos familiares. Antes da descrição da mutação *JAK2 V617F*, eram conhecidos casos de aglomerações familiares de pacientes com NMPc. Bellanné-Chantelot *et al.* <sup>(15)</sup> avaliaram 72 famílias com mais de um caso de NMPc quanto à presença da mutação. Entre as 46 famílias com ao menos dois casos de PV, TE ou MF, a mutação estava ausente em 6 delas, distribuída heterogeneamente em 18 e presente em todos os pacientes em 22 famílias. Nos pacientes portadores da mutação, foram purificados e avaliados os linfócitos B e T sendo que, nesta população celular, a mutação não foi encontrada corroborando, novamente, para a natureza adquirida da mutação. Comparando casos familiares e esporádicos, os autores encontraram freqüências semelhantes da mutação.

Landgren *et al.* <sup>(16)</sup> publicaram um estudo avaliando o risco de apresentar PV, MF e TE em parentes de primeiro grau de pacientes previamente diagnosticados com NMPc. Avaliando registros de diagnósticos oncológicos, iniciados na Suécia na década de 50 e mantidos até os dias atuais, foram encontrados 11039 pacientes com diagnóstico de NMPc. Foram procurados e encontrados registros médicos referentes a 24577 parentes de primeiro grau destes pacientes. Observou-se um aumento de 5 a 7 vezes no risco de NMPc em parentes de primeiro grau de pacientes com NMPc, sugerindo que estas pessoas compartilhem genes que aumentem a suscetibilidade a PV, TE, MF. O maior risco de apresentar a doença foi observado entre irmãos.

Pardanani *et al.* <sup>(17)</sup>, com o objetivo de testar o paradoxo de uma única mutação ser responsável pelo desenvolvimento de 3 entidades patológicas com características distintas, procuraram fatores próprios aos pacientes que poderiam contribuir para tal diversidade. Foram pesquisados 4 genes candidatos na via de sinalização JAK-STAT: os receptores de eritropoetina (*EPOR*), trombopoetina (*MPL*), fator estimulante de colônias granulocíticas (*GCSFR*), e o gene *JAK2*. A análise do fenótipo relacionada ao genótipo evidenciou 3 SNPs no gene *JAK2* (rs7046736, rs10815148 e rs12342421) associados com PV e TE, mas não com MF. Três outros SNPs no gene *JAK2* (rs19758669, rs3808850 e rs10974947) e um único SNP no gene *EPOR* (rs318699) estavam associados com PV, porém não com MF ou TE. Os demais genes pesquisados não mostraram correlação com os fenótipos observados. Foi

também observado que os haplótipos do gene *JAK2* estavam associados somente com PV. Concluiu-se então que fatores genéticos individuais poderiam contribuir para a diversidade de apresentações fenotípicas observadas nas NMPc, inclusive na presença da mutação *JAK2 V617F*.

Jones *et al.* <sup>(18)</sup>, considerando as observações de Pardanani, pesquisaram SNPs no gene *JAK2*. Sabendo que os casos de homozigose para a mutação *JAK2 V617F* ocorrem por dissomia uniparental, Jones encontrou 109 (77%) casos de haplótipos idênticos do gene *JAK2* em 142 alelos que abrigavam a mutação *JAK2 V617F*. Comparativamente, no alelo residual selvagem, tal haplótipo foi identificado em apenas 12% das vezes. Tal resultado mostrou que a homozigidade para a mutação *JAK2 V617F* não ocorre aleatoriamente mas, preferencialmente, em um haplótipo específico do gene *JAK2*.

Comparando 14 diferentes SNPs do gene *JAK2*, Jones *et al.* <sup>(18)</sup> conseguiram inferir 92 haplótipos do gene. Dois haplótipos, 46 e 1, referidos conjuntamente como haplótipo 46/1 foi encontrado mais frequentemente em pacientes com NMPc portadores da mutação *JAK2 V617F* do que na população em geral. Avaliações adicionais mostraram que a mutação ocorria, preferencialmente, em *cis* com o haplótipo 46/1.

Utilizando a técnica de *array*, Kilpivaara *et al.* <sup>(19)</sup> pesquisaram SNPs genômicos que poderiam predispor o aparecimento de NMPc ou atuar como modificadores fenotípicos de tais doenças. Os autores identificaram variações em alguns *loci* do gene *JAK2* cuja frequência variava de acordo com o fenótipo da NMPc. O SNP rs10974944, que caracteriza o alelo G do gene *JAK2*, estava mais frequentemente associado a PV do que a TE e também ocorria em maior frequência em pacientes portadores de NMPc do que na população em geral. O alelo G também estava mais fortemente associado a presença da mutação *JAK2 V617F* (OR: 4,0; P:  $7,7 \times 10^{-22}$ ) do que aos casos sem a mutação (OR: 2,1; P:  $6,7 \times 10^{-5}$ ). Os autores identificaram que a mutação *JAK2 V617F* ocorria, preferencialmente, em *cis* com o alelo G sugerindo que a presença do alelo predispõe a aquisição da mutação.

É possível que a presença do alelo G, parte do haplótipo 46/1, predisponha o aparecimento da mutação *JAK2 V617F* por facilitar a substituição de guanina por timina, modificando o códon 617. Outra possibilidade não excludente seria o haplótipo 46/1 oferecer vantagem proliferativa ou de sobrevivência às células portadoras comparativamente a outros haplótipos quando estes adquirissem a mutação <sup>(20)</sup>.

Utilizando a técnica de PCR-RFLP, Trifa *et al.* <sup>(21,22)</sup> desenvolveram um método simples e reprodutível de identificar o SNP rs10974944 do gene *JAK2* e testaram em 150 pacientes portadores de NMPc comparando-os com outros 150 indivíduos saudáveis. Em concordância com as observações previamente feitas, o autor encontrou maior frequência do alelo G entre os pacientes com NMPc do que na população em geral.

A avaliação de fatores genéticos associados ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas crônicas ajuda na identificação de fatores de risco hereditários e possibilita o desenvolvimento de testes diagnósticos voltados para a identificação e caracterização das diferentes causas de policitemias e o risco de transformação neoplásica. O conhecimento destes fatores genéticos serve ainda de base para o desenvolvimento de possíveis alvos terapêuticos futuros.

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a frequência do haplótipo 46/1 pela identificação do SNP rs10974944, característico do alelo G do gene *JAK2*, em nossa população, e comparar indivíduos portadores de NMPc com indivíduos saudáveis e avaliar a associação entre a presença da mutação *JAK2 V617F* com o alelo G do gene *JAK2*.

## **OBJETIVOS:**

**Objetivo geral:** Estudar a frequência dos haplótipos do gene *JAK2* e avaliar sua associação com neoplasias mieloproliferativas crônicas.

### **Objetivos específicos:**

1. Avaliar a presença da mutação V617F do gene *JAK2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas;
2. Identificar o haplótipo do gene *JAK2* (pesquisa do alelo G pelo SNP *rs10974944*);
3. Estimar as frequências alélicas e genotípicas para estes genes polimórficos nesta população;
4. Avaliar, por meio de uma análise estatística adequada, uma associação da presença do alelo G com a mutação V617F do gene *JAK2*;

**Referências Bibliográficas:**

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Ed.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer: 2008. 439p.
2. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6:372-5.
3. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497-00.
4. Prchal JF, Axelrad AA. Bone marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1974;290:1382.
5. Dai CH, Krantz SB, Means RT Jr, Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera blood burst-forming units-erythroid are hypersensitive to interleukin-3. *J Clin Invest*. 1991;87:391-6.
6. Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood*. 2000;96:3310-21.
7. Komura E, Chagraoui H, Mansat de Mas V, Blanchet B, de Sepulveda P, Larbret F, *et al*. Spontaneous STAT5 activation induces growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood*. 2002;100:2932-40.
8. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lécluse Y, Debili N, *et al*. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2004;32:179-87.
9. Roder S, Steimle C, Mainhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with polycythemia rubra vera. *Exp Hematol*. 2001;29:694-02.
10. Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*. 2000;19:5662-79.

11. Jones AV, Krei IS, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, *et al.* Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2005;106:2162-8.
12. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet.* 2005;365:1054-61.
13. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg J. *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352:1779-90.
14. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature.* 2005;434:1144-8.
15. Bellané-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;108:346-52.
16. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson EA, Helgadóttir EA, Samuelsson J, Björkholm M, *et al.* Increased risk of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24577 first-degree relatives of 11039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood.* 2008;112:2199-04.
17. Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood.* 2008;111:2785-9.
18. Jones AV, 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;41:446-9.
19. 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 JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 2009;41:455-9.

20. Goldin LR, Bjorkholm M, Kristinsson SY, Samuelsson J, Landgren O. Germline and somatic JAK2 mutations and susceptibility to chronic myeloproliferative neoplasms. *Genome Medicine*. 2009;1:55.
21. Trifa AP, Cucuianu A, Ljubomir P, Urian L, Militaru MS, Dima D, Pop IV, Popp RA. The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of the JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*. 2010;DOI 10.1007/s00277-010-0960-y.
22. 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 JAK2 V617F. *Acta Haematol*. 2010;123:84-7.

## **CAPÍTULO II**

**Article: EVALUATION OF THE JAK2 46/1 HAPLOTYPE ASSOCIATION WITH  
THE PRESENCE OF CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS IN  
BRAZILIAN POPULATION**

## Evaluation of the JAK2 46/1 haplotype association with the presence of chronic myeloproliferative neoplasms in Brazilian population

Sarah Pagliarini e Silva<sup>1,2</sup>, Bruna Cunha Santos<sup>1</sup>, Elizangela Mendes de Figueiredo Pereira<sup>1</sup>,  
Mari Ellen Ferreira<sup>2</sup>, Elaine Cristina Baraldi<sup>3</sup>, Ana Maria Sell<sup>1</sup>, Jeane Eliete Laguila  
Visentainer<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background:** The JAK2 46/1 haplotype has recently been described as a major contributor factor to the development of myeloproliferative neoplasm either positive or negative for the JAK2 V617F mutation. The G allele of a specific single nucleotide polymorphism, called JAK2 rs10974944, is part of the JAK2 46/1 haplotype. The aim of this study is to verify the association between the presence of the G allele and the development of BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms in our population.

**Methods:** Blood and oral mucosa swabs samples were obtained from 56 patients, from two local Brazilian hospitals, previously diagnosed as having BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms. Blood samples from 90 local blood donors were used as controls. The presence of the G allele was accessed using a PCR-RFLP assay after DNA sample extraction.

**Results:** The presence of the G allele was strongly associated with the presence of BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms ( $p=0.0001$ ;  $OR=2.674$ ;  $95\% CI=1.630-4.385$ ) in the studied population.

**Conclusion:** In agreement with previous reports, the JAK2 46/1 haplotype, represented here by the presence of the G allele, is an important predisposing factor in the oncogenetic development of these neoplasms in our population.



**Keywords:** Myeloproliferative disorders, JAK2 V617F mutation, JAK2 46/1 haplotype.

---

<sup>1</sup> Immunogenetics Laboratory, Department of Clinical Analysis, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, Brazil. <sup>2</sup> Hospital do Câncer de Maringá, Maringá, PR, Brazil. <sup>3</sup> Instituto do Câncer de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

**Corresponding author:** Sarah Pagliarini e Silva, MD. Immunogenetics Laboratory, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Av. Colombo 5790, Bloco I90 sala 102, CEP: 87020-900 - Maringá, PR.

Tel: 55 44 3011-4864. E-mail: sspagliarini@yahoo.com.br

## INTRODUCTION

Chronic myeloproliferative neoplasms (cMPN) are disorders characterized by the clonal proliferation of a single hematopoietic stem cell resulting in increased peripheral blood counts of mature cells. In 2008, the World Health Organization (WHO) diagnostic criteria divided these entities in well defined diseases represented mainly by chronic myeloid leukemia (CML), polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (MF) <sup>(1)</sup>.

Albeit these disorders may have specific features, they often share some characteristics that overlap and an exact classification may become jeopardizing. Dameshek <sup>(2)</sup>, more than fifty years ago, noticed similarities between these neoplasms and suggested that a common factor could act as a trigger leading to the disordered proliferation of the bone marrow myeloid compartment. It took more than five decades to figure out what would be this hidden stimulus and, in 2005, several research groups described almost simultaneously a single nucleotide polymorphism (SNP) in the JAK2 gene <sup>(3,4,5,6)</sup>.

JAK2 gene encodes a tyrosine kinase protein involved in intracellular signaling pathways activated by different cytokines and growth factors receptors<sup>(7)</sup>. JAK2 gene is located in chromosome 9 (9p24) and the described SNP leads to the substitution of a valine to a phenylalanine residue in the 617 position (JAK2 V617F) of the resulting protein. JAK2 V617F mutation occurs in the pseudo-kinase domain, with a consequent lost of the regulatory function performed by this region, allowing intracellular pathways to be active despite the absence of interaction between growth factors and receptors <sup>(3,4,5,6)</sup>.

JAK2 V617F mutation was found in more than 95% of the PV patients and in about half of the patients with ET and MF, but not in healthy individuals. The evaluation of lymphocytes and oral mucosa patient's cells, as well as patient's family blood cells, were negative for JAK2 V617F mutation showing that the mutation was acquired <sup>(3,4,5,6)</sup>. After these findings, JAK2 V617F mutation screening became a cornerstone in the molecular diagnostic approach of cMPN <sup>(1,8)</sup>.

It was observed that JAK2 V617F mutation could occur in homozygosis or in heterozygosis in the affected hematopoietic cells. The homozygotic cases occurred most frequently in a specific allele with duplication of the mutated allele and consequent lost of the other allele <sup>(3)</sup>. This event is called uniparental disomy. JAK2 V617F homozygosity mainly occurs in PV cases and seems to confer proliferation advantage to the mutated clone <sup>(3)</sup>.

Even before the description of a common mutation associated with the development of cMPN, family clusters of patients sharing different types of these disorders were already known. In 2006, Bellané-Chantelot *et al.*<sup>(9)</sup> evaluated 72 families with two or more cases of cMPN regarding the presence of the JAK2 V617F mutation. In 46 families with at least two cases of cMPN, the mutation was absent in 6 families, heterogeneously distributed in 18 families and present in all affected members in 22 families. The authors also isolated B and T lymphocytes in healthy relatives of patients carrying the mutation and the JAK2 V617F mutation was absent showing, once more, its acquired characteristic.

Landgren *et al.*<sup>(10)</sup> studied the risk of PV, ET and MF development in first degree relatives of previously cMPN diagnosed patients. The authors analyzed more than five decades Swedish oncologic diagnostic registries and found 11039 patients with different cMPN diagnosis. Searching for first degree relatives medical registries, they met 24577 relatives. It was observed a 5 to 7 times increased risk of developing cMPN in these first degree relatives, particularly in probands, suggesting that family members may share genes involved in myeloproliferative disorders oncogenesis.

Pardanani *et al.*<sup>(11)</sup> studied genetic factor that could contribute to the phenotypic diversity of cMPN. The authors observed some JAK2 gene SNPs and haplotypes to occur more frequently in PV patients than in ET or MF patients. They suggested that individual genetic factor could contribute to the cMPN diverse phenotypic presentation, including the development of JAK2 V617F mutation as notably observed in PV patients.

In the light of the above findings, Jones *et al.*<sup>(12)</sup> analyzed different JAK2 SNPs. Considering uniparental disomy as the main cause of JAK2 V617F mutation homozygosity, the authors found 109 (77%) cases of identical JAK2 haplotypes in 142 alleles that harbored JAK2 V617F mutation. In the wild residual allele, comparatively, this haplotype was found in only 12% of the cases. Then, the authors could conclude that JAK2 V617F mutation does not occur randomly but rather in a specific JAK2 gene haplotype.

Comparing different JAK2 gene SNPs, Jones *et al.*<sup>(12)</sup> identified 92 different haplotypes. Two of them, referred together as 46/1 haplotype, occurred in greater frequency in those patients carrying JAK2 V617F mutation than in the general population. Additional studies demonstrated the JAK2 V617F mutation occur more frequently in *cis* with the 46/1 haplotype.

Starting with array techniques, Kilpivaara *et al.*<sup>(13)</sup> searched for genomics SNPs that could predispose the development of cMPN or act as phenotypic modifiers in these diseases. The JAK2 G allele, characterized by the presence of rs10974944 SNP, occurred more frequently in PV than in ET patients. It was also more frequently found in cMPN patients than in the general population. The C allele, characterized by the absence of rs10974944 SNP was considered the common allele often observed in general population. The G allele was also strongly associated with JAK2 V617F mutation (OR: 4,0;  $p = 7,7 \times 10^{-22}$ ), both occurring more frequently in *cis*.

In order to facilitate the identification of JAK2 rs10974944 SNP, Trifa *et al.*<sup>(15, 16)</sup> developed a practical method based on polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. The authors compared 150 cMPN patients with 150 healthy controls and also found a greater G allele frequency in those patients.

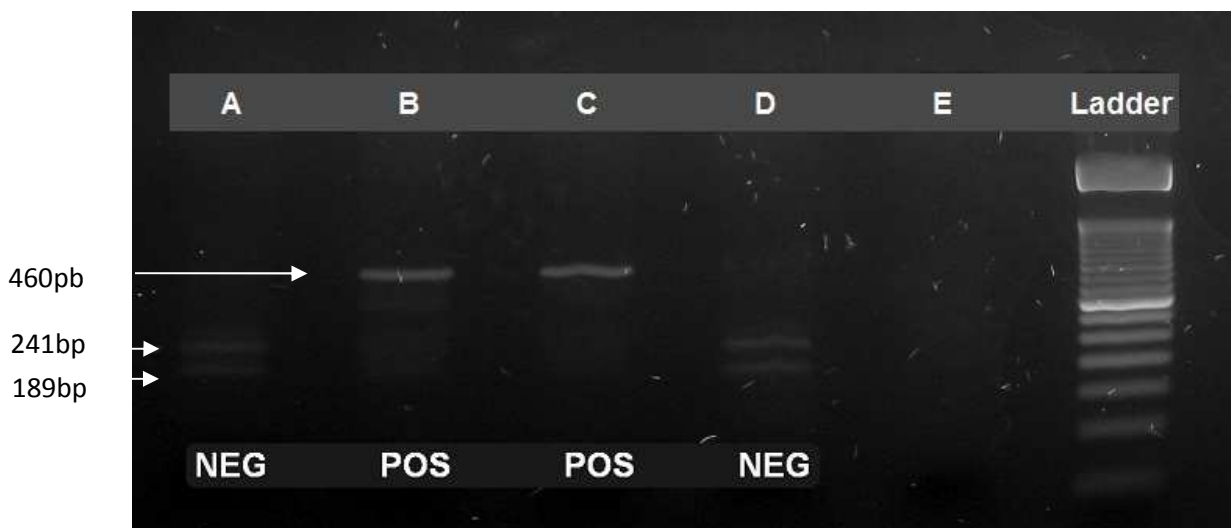
The aim of the present study is to analyze the possible association between the the G allele in cMPN patients and to verify its role in the development of these diseases in a Brazilian population.

## METHODS

The study was submitted and approved by the local ethical committee. All participants signed an informed consent. Blood and oral swab samples were collected from 56 patients assisted in two regional oncologic services (Hospital do Câncer de Maringá e Instituto do Câncer de Londrina), previously diagnosed as having BCR-ABL negative cMPN according to the 2008 WHO diagnostic criteria<sup>(1)</sup>. Blood samples were collected from 90 healthy individuals (blood donors from the Hemocentro Regional de Maringá) who were used as controls, since JAK2 V617F mutation is not found in general healthy population<sup>(3,4,5,6,17)</sup>.

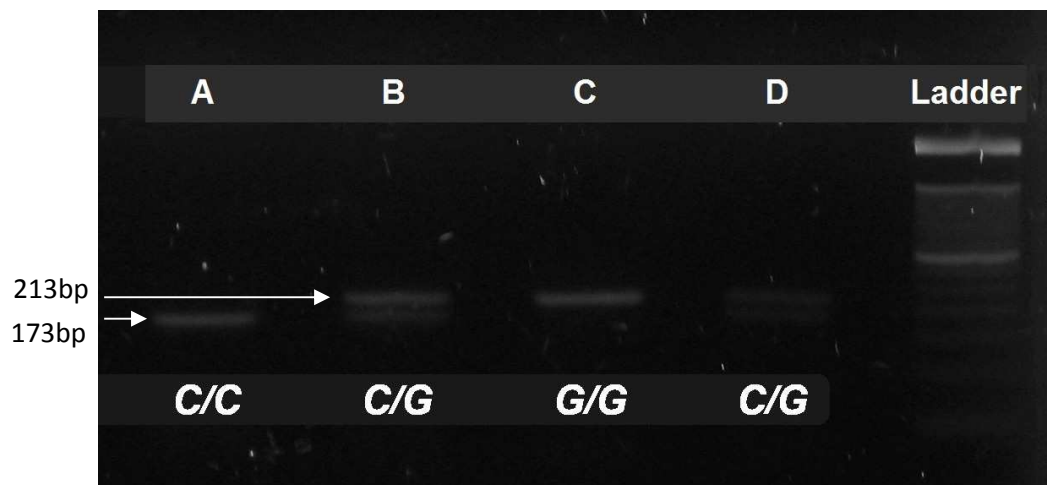
DNA was extracted from the biological specimens with a commercial kit according to the fabricant's recommendations (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen).

All blood samples obtained from cMPN patients were genotyped for JAK2 V617F mutation using a PCR-RFLP assay previously described<sup>(18)</sup>. In order to visualize better the post digestion bands, we modified the described technique using 2U (1µL) of *BsaXI* enzyme in each PCR amplicon digestion and a 3% agarose gel to run the post digestion electrophoresis. JAK2 V617F positive samples present a 460bp band (Figure 1). JAK2 V617F negative samples show two bands weighting 241bp and 189bp. Absolute and relative frequencies of JAK2 V617F mutation in cMPN patients were calculated.



**Figure 1. JAK2 V617F screening using PCR-RFLP technique.** After digestion, JAK2 V617F positive samples present a 460bp band compared to the 50bp molecular weight ladder. (A) ET JAK2 V617F negative patient. (B) PV JAK2 V617F positive patient. (C) JAK2 V617F positive control. (D) JAK2 V617F negative control. (E) Blank.

Considering the possibility of heterozygosity loss due to uniparental disomy leading to misinterpretation of haplotypes results, germline haplotypes (oral swab) were compared to blood samples in cMPN patients. Blood and oral swab samples obtained from cMPN patients and blood samples obtained from healthy subjects were submitted to JAK2 rs10974944 SNP screening using a PCR-RFLP assay developed by Trifa *et al.*<sup>(16)</sup>. The G allele presence is characterized by the observation of a 213bp band whereas the C allele presence is noted by the observation of a 176bp band (Figure 2).



**Figure 2. *JAK2* rs10974944 SNP alleles screening using PCR-RFLP technique.** The G allele presence is characterized by the observation of a 213bp band whereas the C allele presence is noted by the observation of a 176bp band compared to the 50bp molecular weight ladder. Lanes A-D represent patients' blood samples. (A) C allele homozygous. (B) C/G alleles heterozygous. (C) G allele homozygous. (D) C/G alleles heterozygous.

Allelic and genotypic frequencies were calculated by direct count. Patients and controls allelic and genotypic frequencies were compared using a Chi-Square test, with Yates' correction, considering a 95% confidence interval (CI).

## RESULTS

The overall characteristics of cMPN patients enrolled in this study are shown in Table 1. When analyzing each one of the cMPN alone, 16 (94%) of the 17 PV patients, 14 (64%) of the 22 ET patients and 7 (58%) of the 12 MF patients were positive for *JAK2* V617F mutation. There were 5 (10% of 56) patients that could not be classified as having one of those three well determined entities and, therefore, were classified as myeloproliferative neoplasms, unclassifiable (MPNu), according to 2008 WHO diagnostic criteria<sup>(1)</sup>. Some of those patients lacked some information in their medical records or clinical history that could have compromised the correct classification. *JAK2* V617F mutation screening in those patients showed 80% (4 of the 5 MPNu patients) of positivity corroborating to fit them in the BCR-ABL negative cMPN group.

**Table 1. cMPN patients general characteristics and JAK2 V617F mutational status**

<b>Age</b> (median range, in years)	22-83 (60.6)
<b>Sex</b>	
Male	25 (45%)
Female	31 (55%)
M:F	0.8:1
<b>Diagnosis</b>	
<b>PV</b>	17 (30%)
JAK2 V617F positive	16 (94%)
JAK2 V617F negative	1 (6%)
<b>ET</b>	22 (39%)
JAK2 V617F positive	14 (64%)
JAK2 V617F negative	8 (36%)
<b>MF</b>	12 (21%)
JAK2 V617F positive	7 (58%)
JAK2 V617F negative	5 (42%)
<b>MPNu</b>	5 (10%)
JAK2 V617F positive	4 (80%)
JAK2 V617F negative	1 (20%)
<b>TOTAL</b> (cMPN patients)	56

cMPN: chronic myeloproliferative neoplasms, PV: polycythemia vera, ET: essential thrombocytosis, MF: primary myelofibrosis, MPNu; myeloproliferative neoplasms, unclassifiable.

The distribution of JAK2 rs10974944 SNP genotypes and alleles are shown in Table 2, considering the JAK2 V617F mutational status.

**Table 2. JAK2 rs10974944 SNP genotype/alleles frequencies in cMPN patients and controls**

JAK2rs10974944 genotype/alleles	cMPN patients			Controls (n=90)
	<i>JAK2 V617F positive (n=43)</i>	<i>JAK2 V617F negative (n=13)</i>	<i>Total (n=56)</i>	
<b>Genotype</b>				
<i>CC</i>	11 (26%)	7 (54%)	18 (32%)	53 (59%)
<i>CG</i>	17 (40%)	3 (23%)	20 (36%)	25 (28%)
<i>GG</i>	15 (34%)	3 (23%)	18 (32%)	12 (13%)
<b>Allele</b>				
<i>C allele</i>	39 (45%)	17 (65%)	56 (50%)	131 (73%)
<i>G allele</i>	47 (55%)	9 (35%)	56 (50%)	49 (27%)

cMPN: chronic myeloproliferative neoplasms, SNP: single nucleotide polymorphism



When comparing JAK2 rs10974944 SNP genotypes and alleles frequencies between patients and controls (Table 3), it was found a significantly higher frequency of the GG genotype and G allele in cMPN patients ( $p=0.01159$ ; OR=3.079; 95% CI=1.347-7.04 and  $p=0.0001$ ; OR=2.674; 95% CI=1.630-4.385, respectively). The CC genotype and C allele frequency were significantly more increased in healthy controls ( $p=0.00294$ ; OR=0.331; 95% CI=0.164-0.666 and  $p=0.0001$ ; OR=0.374; 95% CI=0.228-0.614, respectively).

**Table 3. Correlation between JAK2 rs10974944 SNP genotype/alleles frequencies and the presence of cMPN (cMPN patients vs control group)**

JAK2rs10974944 genotype/alleles	cMPN patients vs control group			
	Patients (n=56)	Controls (n=90)	OR (95% CI)	<i>p</i> value
<b>Genotype</b>				
<i>CC</i>	18 (32%)	53 (59%)	0.331 (0,164-0.666)	0.00294
<i>CG</i>	20 (36%)	25 (28%)	1.44 (0.706-2.953)	0.4
<i>GG</i>	18 (32%)	12 (13%)	3.079 (1.347-7.04)	0.01159
<b>Allele</b>				
<i>C allele</i>	56 (50%)	131 (73%)	0.374 (0.228-0.614)	0.0001
<i>G allele</i>	56 (50%)	49 (27%)	2.674 (1.630-4.385)	0.0001

cMPN: chronic myeloproliferative neoplasms, SNP: single nucleotide polymorphism

There was also significant statistical association between the presence of JAK2 V617F mutation and the JAK2 rs10974944 SNP genotype or allele, when comparing patients who carried the mutation with controls (Table 4). The GG genotype and the G allele were more frequently found in patients who carried the mutation than in healthy controls ( $p=0.006$ ; OR=3.482; 95% CI=1.454-8.339 and  $p=0.0001$ ; OR=3.222; 95% CI= 1.884-5.510, respectively).

**Table 4. Correlation between JAK2 rs10974944 SNP genotype/alleles frequencies and the presence of JAK2 V617F mutation (JAK2 V617F positive patients vs control group)**

JAK2rs10974944 genotype/alleles	JAK2 V617F positive patients vs control group			
	JAK2 V617F positive patients (n=43)	Controls (n=90)	OR (95% CI)	<i>p</i> value
<b>Genotype</b>				
CC	11 (26%)	53 (59%)	0.24 (0.108-0.536)	0.0006
CG	17 (40%)	25 (28%)	1.7 (0.790-3.656)	0.244
GG	15 (34%)	12 (13%)	3.482 (1.454-8.339)	0.0078
<b>Allele</b>				
C allele	39 (45%)	131 (73%)	0.311 (0.182-0.531)	0.0001
G allele	47 (55%)	49 (27%)	3.222 (1.884-5.510)	0.0001

cMPN: chronic myeloproliferative neoplasms, SNP: single nucleotide polymorphism

The comparison between JAK2 rs10974944 SNP genotype or allele frequencies in JAK2 V617F negative patients and controls showed no statistical difference (data not shown). Also, when comparing JAK2 rs10974944 SNP genotype or allele frequencies in JAK2 V617F positive with negative patients there was no statistical difference, unlike previously described (12,13,15). This observation may possibly be explained by the modest number of patients enrolled in this study.

## DISCUSSION

Recent reports have suggested that hereditary genetic factors, specifically JAK2 haplotypes, can strongly contribute to the development of cMPN<sup>(12,13,15)</sup>. These observations help explain previously known cMPN family clusters<sup>(9,10)</sup>.

The aim of this study was to analyze if the genetic factors described above also play an important role in the development of cMPN in our population. The results of our study corroborate the hypothesis that JAK2 haplotypes are a major predisposal factor in the studied population. The GG genotype and G allele frequencies, representative of the JAK2 46/1 haplotype, were found to be significantly higher in our patients' population. Oral swabs results (data not shown) were also concordant with blood samples results discarding acquired uniparental disomy as a misleading factor in the genotype and alleles frequencies estimation.

The correlation between JAK2 46/1 haplotype and the presence of JAK2 V617F mutation was well documented<sup>(12,13)</sup>. The JAK2 46/1 haplotype was suggested to bring genetic instability to the JAK2 gene favoring the emergence of JAK2 acquired mutations such JAK2 V617F and JAK2 exon 12 mutations<sup>(14,19)</sup>. Our data can reinforce these findings since the G allele and the GG genotype were more frequent in those patients carrying JAK2 V617F mutation than in healthy controls.

As shown in Table 1, the characteristics of the studied patients are very similar to those observed in literature<sup>(3,4,5,6)</sup> what can reassure the comparability of our data and reinforce the meaning of the G allele presence as a pivotal factor in the development of cMPN in our population.

Different hypotheses try to explain the correlation between specific JAK2 haplotypes and the cMPN risk. One of them, as mentioned above, is the possibility of a genetic instability brought by the presence of a specific inherited haplotype facilitating the emergence of JAK2 acquired mutation<sup>(14)</sup>. Another hypothesis suggests that JAK2 46/1 haplotype could confer proliferative or surviving advantage to the neoplastic clone what can explain the increased frequency of JAK2 46/1 haplotype even in cMPN negative for JAK2 gene acquired mutations

<sup>(13)</sup>. There is also a chance that the JAK2 involved haplotypes could lead to different intensities of intracellular signaling conferring the mentioned proliferative or surviving advantage <sup>(14,15)</sup>. These hypotheses can coexist and even work together in the cMPN oncogenesis.

The evaluation of genetic factors implicated in the chronic myeloproliferative disorders development helps to identify acquired mutations such as JAK2 V617F and allows diagnostic assays to be developed. Recently, these molecular assays became a precious tool in the evaluation of patients presenting with polycythemia making diagnostic workup easier. In the light of the recent published data, inherited genetic factors were brought about as important characters in the cMPN oncogenetic pathways. More studies are needed to clarify the exact role these genetic factors in modifying intracellular signaling and perhaps offer new targets to future diagnostic tools or even therapeutic agents.

### **Acknowledgements**

The authors are thankful to all the professional of the Hemocentro Regional de Maringá who offered the control's samples and to the professionals of the Laboratory of Molecular Diagnostic on Oncohematologic Diseases from Unicamp, especially Daiane de Almeida and Dr Katia Pagnano, who kindly helped with technical advice concerning the molecular techniques employed in this study.

## REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Ed.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer: 2008. 439p.
2. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6:372-5.
3. Jones AV, Krei IS, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, *et al*. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106:2162-8.
4. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al*. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet*. 2005;365:1054-61.
5. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg J. *et al*. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-90.
6. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C. *et al*. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-8.
7. Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*. 2000;19:5662-79.
8. Barcelos MM, Santos-Silva MC. Molecular approach to diagnose BCR/ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33:290-6.
9. Bellané-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;108:346-52.

10. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson EA, Helgadóttir EA, Samuelsson J, Björkholm M, *et al.* Increased risk of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24577 first-degree relatives of 11039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*. 2008;112:2199-04.
11. Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111:2785-9.
12. Jones AV, 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;41:446-9.
13. 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 JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41:455-9.
14. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Samuelsson J, Landgren O. Germline and somatic JAK2 mutations and susceptibility to chronic myeloproliferative neoplasms. *Genome Medicine*. 2009;1:55.
15. Trifa AP, Cucuianu A, Ljubomir P, Urian L, Militaru MS, Dima D, Pop IV, Popp RA. The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of the JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*. 2010;DOI 10.1007/s00277-010-0960-y.
16. 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 JAK2 V617F. *Acta Haematol*. 2010;123:84-7.
17. Monte-Mór BCR, Costa FF. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30:241-8.
18. Monte-Mór BCR, Cunha AF, Pagnano KBB, Saad ST, Lorand-Metze I, Costa FF. JAK2 V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Genet Mol Biol*. 2007;30:336-8.

19. Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, Li S, Cazzola M, Pietra D, *et al.* The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia.* 2009;23:1924-6.

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

A realização deste estudo com pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas crônicas mostrou que:

1. A amostra de pacientes avaliada, apesar de relativamente pequena (n=56), mostrou características epidemiológicas muito semelhantes às grandes coortes previamente descritas possivelmente permitindo comparações com outras populações.
2. O genótipo GG e o alelo G mostraram-se como um importante fator de risco genético para o desenvolvimento de NMPc em nossa população alertando sobre a possibilidade do risco aumentado em familiares de pacientes portadores e auxiliando o planejamento de aconselhamento genético a pacientes e familiares. Ademais, a identificação do alelo G pode servir como uma informação adicional para a elucidação de casos de suspeitos de NMPc, cujo diagnóstico pode ser duvidoso.
3. A padronização de ambos os testes (pesquisa da mutação JAK2 V617F e JAK2 rs10974944 SNP) em um serviço público acadêmico abre a possibilidade de acesso a estes exames, até então disponíveis somente em centros acadêmicos de referência ou na rede privada, para pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A pesquisa da mutação JAK2 V617F facilita de maneira única investigação dos casos de policitemia e foi previamente descrita como sendo custo-efetiva para os sistemas de saúde uma vez que abrevia a necessidade de outros exames dispendiosos, e muitas vezes invasivos, durante a investigação diagnóstica.



## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

A multidisciplinaridade característica do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual de Maringá possibilita o crescimento e aprimoramento da equipe pesquisadora promovendo enfoques mais abrangentes nos projetos realizados.

A pesquisa básica em saúde sempre serviu de plataforma para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e terapêuticas. Há ainda muito a ser descoberto acerca de como a interação entre citocinas, fatores de crescimento, receptores e proteínas envolvidas nas vias de sinalização intracelular colaboram para o aparecimento das NMPc e de como fatores genéticos hereditários e adquiridos interagem com estas variáveis. O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos e dos fatores genéticos associados ao desenvolvimento das NMPc abre possibilidades de futuros projetos de colaboração entre a pesquisa básica e a pesquisa clínica.