



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ELLEN KARINE MARQUES RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA POLICITEMIA VERA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no formato de artigo ao UniCEUB como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Graziela Silveira Araújo Alves

BRASÍLIA
2017

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por todas as coisas e principalmente por ter me dado saúde para continuar e força para jamais desistir nos momentos de aflição.

A minha mãe pelo amor benevolente, carinho e colo me ofertados durante os momentos de angústia, por todo apoio e incentivo me dado durante todos os anos nessa jornada. Ao meu padrasto por sempre estar disposto a me ajudar. E a toda minha família.

A minha orientadora Graziela Silveira Araujo Alves a qual sou extremamente grata pelo suporte, atenção, dedicação e companheirismo dos projetos que embarcamos juntas. Obrigada por dividir comigo um pouco do conhecimento absurdo que você carrega dentro de você.

Em especial à minha avó Antonia Pereira que durante a vida sempre foi meu alicerce, minha grande conselheira, amiga e instrutora.

A minha amiga Nayra Rezende pelas noites em claro ouvindo minhas lamentações e murmúrios. As amizades que fiz durante o curso, aos colegas de sala dos quais tenho apreço e tive o prazer de conhecer melhor, levarei um pedaço de cada um de vocês comigo.

A todos os professores obrigada por compartilharem do seu conhecimento. A todas as pessoas que trabalham no labocien. A tia da cantina que sempre foi muito amável comigo. Ao tio da portaria que sempre foi muito educado e gentil. A todas as pessoas que passaram na minha vida e de alguma forma estiveram ligadas diretamente ou indiretamente a minha formação.

Caracterização do diagnóstico molecular para Policitemia Vera

Ellen Karine Marques Ribeiro¹
Graziela Silveira Araújo Alves²

Resumo

A policitemia vera (PV) é uma neoplasia mieloproliferativa crônica caracterizada pela expansão clonal de um progenitor hematopoiético, eritrocitose, frequentemente leucocitose e/ou trombocitose e quase sempre mutação ativadora da Janus quinase 2 (mutação JAK2V617F ou JAK2 exon 12), podendo ser identificada em mais de 98% dos pacientes acometidos. O fenótipo proliferativo é acompanhado por uma síndrome inflamatória, cuja base celular e molecular é mal compreendida, este estado inflamatório pode contribuir significativamente para a carga constitucional dos sintomas, a abundância de desses sinais pode ser considerável, em parte impulsionada pela tendência trombótica de pequenos ou grandes vasos, esplenomegalia, fadiga, febre, perda de peso, prurido e risco crônico de transformação da doença para a mielofibrose ou leucemia mielóide aguda. A PV é uma doença rara, muitos pacientes não são diagnosticados ou tem diagnóstico em estado já avançado da doença. Além disso, os pacientes com PV têm um risco aumentado de mortalidade em comparação com a população em geral que muitas vezes resulta de complicações cardiovasculares ou transformação da doença.

Palavras chave: mieloproliferação; mutação, neoplasia hematológica crônica.

Description of the molecular diagnosis for Polycythemia Vera

Abstract

Polycythemia vera (PV) is a chronic myeloproliferative neoplasm characterized by the clonal expansion of a hematopoietic progenitor, erythrocytosis, often leukocytosis and / or thrombocytosis, and almost always Janus kinase 2 (mutation JAK2V617F or JAK2 exon 12 mutation), and can be identified in more than 98% of the patients affected. The proliferative phenotype is accompanied by an inflammatory syndrome, whose cellular and molecular basis is poorly understood; this inflammatory state may contribute significantly to the constitutional burden of symptoms, the abundance of these signs may be considerable, in part driven by the thrombotic tendency of small or large vessels, splenomegaly, fatigue, fever, weight loss, pruritus and chronic risk of transformation of the disease into myelofibrosis or acute myeloid leukemia. PV is a rare disease, many patients are not diagnosed or have an advanced disease diagnosis. In addition, patients with PV have an increased risk of mortality compared to the general population that often results from cardiovascular complications or transformation of the disease.

Key-words: myeloproliferation; mutation, chronic hematologic neoplasia

¹ Estudante de biomedicina do UniCEUB

² Professora do curso de biomedicina do UniCEUB

1. Introdução

William Dameshek, na década de 50, foi o médico pioneiro do termo “síndromes mieloproliferativas” (SMPs) ao identificar que algumas neoplasias hematológicas (Policetemia Vera – PV, Trombocitemia Essencial - TE, Mielofibrose Primária – MP e Leucemia Mielóide Crônica - LMC) derivavam de uma mieloproliferação celular da medula óssea (MO) com intensas características clínico-patológicas similares entre elas (TEFFERI, 2008). Em 2002, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu entre as SMPs, a Leucemia Neutrófila Crônica (LNC), a Síndrome Hipereosinofílica Idiopática (SHI), a Leucemia Eosinofílica Crônica (LEC) e a Mastocitose Sistêmica (MS) (MONTE-MÓR; COSTA, 2008).

As SMPs são caracterizadas por proliferação clonal elevada de uma célula progenitora hematopoiética pluripotente, o progenitor mielóide. Esse aumento anormal pode ser oriundo de uma ou mais séries sanguíneas, envolvendo as linhagens eritrocitária, leucocitária e plaquetária (CHAUFFAILLE, 2010). A etiologia dessas enfermidades vem sendo estudada há anos e propõe-se que há uma desregulação de genes específicos.

Entre as SMPs, destacam-se os estudos genéticos e moleculares em busca por mutações em pacientes diagnosticados com PV, pois esta é a doença mieloproliferativa mais incidente após a LMC que, atualmente, tem sido identificada como uma entidade clínica isolada das demais SMPs. Assim, as pesquisas mostram que a maioria dos casos de PV apresentavam uma alteração no alelo da proteína tirosina cinase Janus (JAK2) devido uma mutação no códon 617 da JAK2 caracterizada pela substituição de uma guanina pela timina com consequente substituição do aminoácido valina por fenilalanina, sendo esta, uma mutação adquirida (LEVINE; GILLILAND, 2016).

A mutação da JAK2 (JAK2+) tem sido identificada como a principal alteração molecular para os pacientes com PV, doença caracterizada pela hiperproliferação clonal da linhagem eritrocitária que pode interferir ou não em outras linhagens (CAO et al., 2006; GRIESSHAMMER, 2006; NORD, 2012). Inesperadamente, essa mesma mutação pode estar presente nas demais SMPs, contudo, levando a quadros fisiopatológicos distintos. Dessa forma, não está claro como uma única mutação está associada a diferentes entidades clínicas, o que aponta para anormalidades genéticas ou pós genéticas adicionais, ainda desconhecidas. Informações recentes ressaltaram

que a expressão anormal de microRNAs (miRNAs) também contribui para a patogênese das neoplasias hematológicas (FERDOWSI, 2015).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi apresentar a caracterização da PV através da identificação de mutações já esclarecidas na literatura, elucidando o mecanismo fisiopatológico da doença.

2. Metodologia

Trata-se de uma revisão bibliográfica visando levantamento de dados nas bases bibliográficas: Ebsco, Bireme, Scielo, MedLine, PubMed. As palavras-chave utilizadas para busca foram: policitemia vera, JAK2, progenitor mielóide, mielodisplasias, síndromes mieloproliferativas crônicas, usadas em língua inglesa e portuguesa.

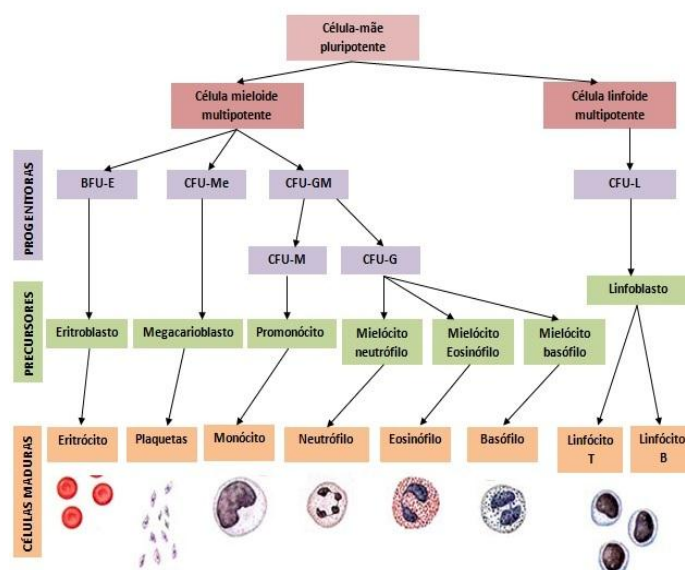
Essas palavras chaves foram utilizadas tanto individualmente quanto em combinação de duas a duas com auxílio do conector “AND”. Quanto aos parâmetros de inclusão, de 63 artigos inicialmente pesquisados, 30 foram inclusos neste artigo por descreverem a policitemia vera e moléculas associadas a mutações. Não foram inclusos artigos que tratassem das demais síndromes mieloproliferativas. O período definido para busca foi de artigos publicados nos últimos 10 anos, sendo selecionados também artigos anteriormente a esse período por se tratar de uma síndrome com incidência baixa.

3. Desenvolvimento

3.1 Caracterização da Policitemia Vera

A hematopoese padrão é policlonal (figura 1) e apta à diferenciação mielóide e linfóide. Contudo, na hematopoese em pacientes com doenças mieloproliferativas crônicas a produção é monoclonal, sendo resultante de um clone tumoral que mantém a capacidade de se diferenciar em células maduras e funcionais. A célula proveniente do clone maligno é a célula tronco hematopoética, que leva a proliferação de precursores anormais na medula óssea com capacidade de crescimento independente de citocinas e hipersensíveis aos diversos fatores de crescimento (TEFFERI, 2005; VASSALO, 2012).

Figura 1. Hematopoese padrão



Fonte: Fernandes (2015).

A Policitemia Vera (PV) é uma doença clonal do sistema hematopoiético com proliferação das linhagens eritrocitária, granulocítica e megacariocítica, cuja manifestação mais eminente é o aumento da massa eritrocitária, com elevação persistente do hematócrito. Essa patologia tem chances de evolução para mielofibrose, mielodisplasia, e leucemia aguda (BARBUI et al., 2011; RIBEIRO et al., 2009).

Idosos e indivíduos do sexo masculino são os mais acometidos pela PV (BOYIADZIS et al., 2007), sendo mais frequente na etnia caucasiana e, historicamente, relatada entre judeus askenazi (CHAITER, 2009). Pacientes tratados possuem uma média de sobrevida entre 10 e 15 anos, porém, sem tratamento, a sobrevida cai para menos de 2 anos. Essa redução na expectativa de vida está associada aos riscos de complicações trombóticas e hemorrágicas em graus variados (BARBUI, 2011).

Embora com algumas limitações relacionadas a epidemiologia, foram descritas a prevalência estimada em 2008 a 2010 de 45 a 57 casos por 100.000 pacientes nos EUA de acordo com as bases de dados de dados *MarketScan* e *Integrated Healthcare Information Services* (STEIN, 2014).

É caracterizada por uma expansão clonal de um progenitor hematopoiético levando a poliglobulia intensa, característica clássica dessa síndrome definida como o aumento contínuo do número de glóbulos vermelhos circulantes por um período

superior a dois meses. Segundo Stein (2014), essa eritrocitose é o parâmetro que a distingue das outras síndromes. Além desse achado laboratorial, frequentemente os pacientes de PV apresentam leucocitose e/ou trombocitose, e quase sempre uma mutação na Janus quinase 2 (JAK2) (STEIN,2014; LEE; ARCASORY, 2015).

Um estudo retrospectivo de 944 pacientes com PV entre 2001 e 2008 relatou que os índices de mortalidade foram considerados maiores em pacientes com PV do que a população em geral, mesmo nos últimos anos. Da mesma forma, um estudo prospectivo de 1.545 pacientes com PV confirmou uma redução na sobrevivência, com mortalidade global influenciada por idade mais avançada, trombose venosa, cariótipo anormal e leucocitose.

O índice de sobrevivência de 10 anos dos pacientes no Registro Sueco do Câncer de 1973 a 2008 foi de 64%, enquanto o índice de sobrevivência para apenas aqueles pacientes documentados de 1993 a 2008 foi de 72%, sugerindo que as taxas de sobrevivência estão melhorando. Essa melhora da sobrevida, reduzindo as taxas de mortalidade ao longo do tempo, pode estar associada a uma maior conscientização dos pacientes e melhores estratégias de tratamento para evitar doenças cardiovasculares e trombóticas consequentes à hiperproliferação eritróide (STEIN, 2014).

3.1.1 Dados Epidemiológicos

Por se tratar de uma síndrome de incidência baixa, não há dados de populações grandes, porém recentemente na Alemanha foi feito um estudo com uma população de 1.476 pacientes portadores de PV, o maior grupo de pesquisa para essa doença já registrado (JENTSCH-ULLRICH, 2016).

A população de pacientes investigada era de idade avançada com 77,1% dos pacientes com idade superior a 60 anos. A proporção de mulheres para homens foram equilibrados com 47,6% de mulheres e 52,4% de homens. Aproximadamente metade dos pacientes foram diagnosticados mais de 5 anos antes da pesquisa (49,9%) e a maioria (92%) foi acompanhada por mais de 1 ano após o diagnóstico. As mutações JAK2V617F foram relatadas em 72,5% e mutações JAK2 Exon12 em mais 1,2% dos pacientes. 3,3% dos pacientes não apresentaram mutação JAK2 detectável. Em 23% dos casos, o estado mutacional de JAK2 não foi investigado (JENTSCH-ULLRICH, 2016).

Do mesmo modo, os níveis de eritropoietina só foram determinados em 40,1% dos pacientes (592/1476). A maioria dos pacientes (76,9%; 455/592) mostrou níveis reduzidos de eritropoietina (EPO) conforme esperado para pacientes com diagnóstico de policitemia vera. No entanto, 20,4% (121/592) de pacientes com PV apresentaram níveis normais de EPO e poucos deles mostraram concentrações elevadas mesmo no soro (2,7%; 16/592) (JENTSCH-ULLRICH, 2016).

Tabela 1. Características dos pacientes.

Características	%	n
Sexo (% , n)		1.476
Masculino	52.4	774
Feminino	47.6	702
Idade (anos)		1.476
<50	7.3	108
51-55	7.7	114
56-60	7.8	115
61-65	10.4	154
66-70	11.3	164
>70	55.4	818
Mutação		1.476
JAKV617F	72.5	1.070
JAK exon 12	1.2	18
JAK- negativo	3.3	48
Desconhecida	23	340
Eritropoietina nível		592
Baixo	76.9	455
Normal	20.4	121
Alto	2.7	16
Tempo desde o diagnóstico (anos)		1.476
<1	7.7	114
1-5	42.1	621
6-10	25.1	375
>10	24.5	362
Desconhecido	0.3	4

Fonte: ULLRICH, 2016.

3.1.2 Avaliação Clínica

Pacientes com PV apresentam manifestações clínicas diversificadas como: prurido, fadiga, esplenomegalia, queixas neurológicas, risco aumentado para eventos trombóticos e hemorrágicos, risco de transformação da doença, seja para mielofibrose (MF) ou leucemia mieloide aguda (LMA), desenvolvimento potencial de malignidades sólidas secundárias e aumento da mortalidade, a qualidade de vida dos pacientes com PV é reduzida e é impactado negativamente pela carga sintomática (STEIN, 2014).

Em 40% dos casos, há relatos de prurido após o banho, provavelmente devido a liberação de histamina por basófilos e mastócitos. A eritromelalgia, evidenciada por dor e queimação nos dedos, é outra sintomatologia muito presente. Queixas

nerológicas como escotomas, diplopia, vertigem e isquemias cerebrais transitórias também podem estar associadas ao diagnóstico, bem como algumas alterações vasculares, cefaleia, perda de peso, sudorese e dispneia (SPIVAK; SILVER, 2008).

Dados revelam que 30% dos pacientes com PV apresentam trombose antes do diagnóstico, além disso, todas as formas de tromboembolismo estão envolvidas. Em 25% dos pacientes pode ocorrer sangramentos leves, devendo-se levar em consideração as hemorragias gastrointestinais prolongadas que podem mascarar a suspeita de PV, curiosamente pacientes com complicações de quadros cirúrgicos podem culminar tanto em quadro de trombose quanto de hemorragias (GISP, 1995).

Em um recente estudo com pacientes diagnosticados com policitemia vera e trombocitemia essencial (TE), foram avaliados uma população de 452 pacientes num período de 8 anos, sendo todos eles diagnosticados dentre os anos de 1973 à 2012. A idade mediana no momento da análise foi de 76 anos (intervalo 45-91). 51 pacientes (11%) desenvolveram carcinoma de células escamosas (SCC) ou carcinoma basocelular (BCC) da pele a partir do diagnóstico, todos os casos, histologicamente confirmados. Ao todo um total de 66 tumores cutâneos dos quais 36 eram BCC e 30 SCC. A distribuição anatômica dos primeiros tumores foi rosto/couro cabeludo (70%), orelha/pescoço (9%), braços (6%), pernas (6%) e tronco (9%) (GÓMEZ, 2016).

Dentre algumas doenças relacionadas à PV, destacam-se a gota e úlceras, e a ocorrência da síndrome de Budd Chiari deve ser ponderada em pacientes com PV, singularmente quando os pacientes apresentam ascite e alterações funcionais hepáticas (BUZZAS et al., 2009). A síndrome de Budd-Chiari é uma condição caracterizada por obstrução de saída venosa hepática que pode levar a congestão grave, hemorragia lobular com fibrose subsequente ou cirrose. Nódulos regenerativos, como hiperplasia nodular focal e hiperplasia regenerativa nodular, também já foram descritas. Processos neoplásicos não relacionados a síndrome de Budd-chiari, como adenoma hepatocelular, carcinoma hepatocelular ou doença metastática também podem ocorrer (PUTRA, 2015)

3.1.3 Avaliação Laboratorial

Laboratorialmente, em análise de hemogramas de pacientes com PV é observado uma celularidade medular elevada com maturação completa, podendo haver hiperplasia de mais de uma linhagem no sangue periférico.

Predominantemente, há uma contagem aumentada da linhagem eritrocitária proporcional à elevação do hematócrito, com presença de hemoglobina para homens superior a 18,5g/dL e, para mulheres, superior a 16,5g/dL. Habitualmente, os pacientes apresentam o valor da massa eritrocitária acima de 25% do valor de referência (BOYIADZIS et al., 2007).

Há neutrofilia em 60% dos casos, casualmente, com presença de células imaturas (mielócitos e metamielócitos) em sangue periférico. A basofilia é encontrada em dois terços dos casos, enquanto que as plaquetas se encontram aumentadas em 50% dos pacientes, podendo chegar a mais de 1 milhão/mm³ em 10% dos casos. (BOYIADZIS et al., 2007) A produção de eritrócitos é controlada de forma estrita principalmente pelo hormônio eritropoetina (EPO). Processos patológicos que incitem o aumento dos níveis séricos de EPO podem levar ao surgimento de PV (JAMES et al., 2005).

3.1.4 Caracterização Molecular

Em 1951, William Dameshek especulou sobre a "atividade proliferativa das células da medula óssea, talvez devido a um estímulo até agora não descoberto", como contribuinte para a patogênese das transgressões mioproliferativas. Quase 55 anos mais tarde, a especulação do Dr. Dameshek foi confirmada quando quatro grupos identificaram de forma independente uma mutação do ponto somático no exon 14 do gene Janus quinase 2 (JAK2), resultando em uma substituição de valina para fenilalanina no codon 617 (JAK2V617F) (STEIN, 2014;MONTE-MÓR et al, 2008).

As alterações genéticas surgem durante o envelhecimento das células estaminais hematopoiéticas em indivíduos saudáveis. A acumulação desses eventos genéticos, como mutações de JAK2, TET2, ASXL1 ou EZH2 contribuem para o surgimento de PV (JENTSCH-ULLRICH, 2016).

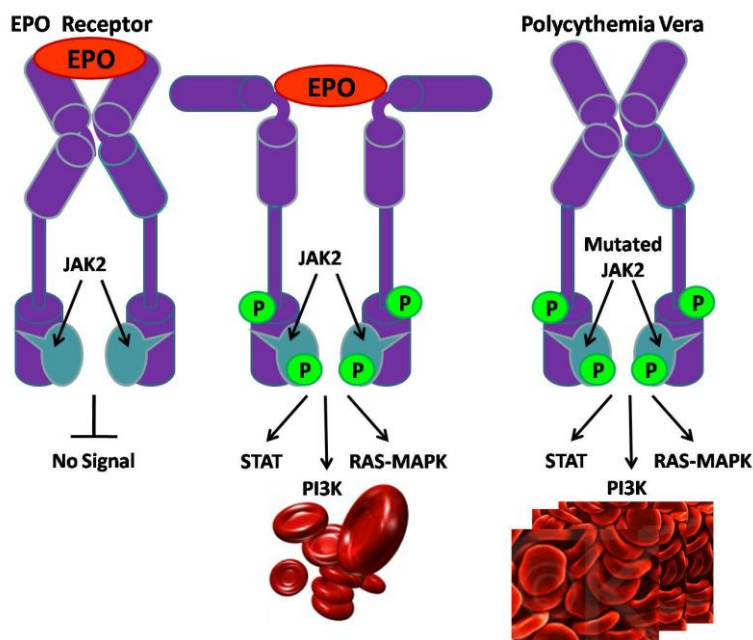
Posteriormente, foi demonstrado que quase todos os pacientes com PV (99%) apresentam uma mutação somática no exon 12 ou 14 de JAK2, com a grande maioria dos pacientes portadores do alelo JAK2V617F. Como tal, não é surpreendente que as mutações JAK2 estejam incluídas entre os principais critérios diagnósticos da Universidade Mundial de Saúde de 2008 para PV (STEIN, 2014).

Nesse contexto, a maioria dos casos de PV provém de uma mutação pontual que altera a codificação da proteína JAK2, (Figura 2) uma tirosina quinase pertencente

à família das Janus quinases, ocorrendo uma substituição de uma guanina por timina (G>T) no éxon 14 do gene JAK. Esta mutação é somática, resultando em uma substituição de uma valina por uma fenilalanina (V>F) na posição 617 da proteína codificada (JAK2V617F), sendo que todas as células descendentes herdarão a alteração com exceção da linhagem linfóide e células da mucosa bucal. Por ter características inespecíficas, ela tem um padrão heterogêneo capaz de formar colônias eritróides mesmo na ausência da eritropoietina (SPIVAK; SILVER, 2008).

A JAK2 quando fosforilada em resposta a diversas citocinas, ativa diferentes vias de sinalização intracelular e participa do processo de transdução de sinal. Contudo, a JAK2V617F na Policitemia Vera faz autofosforilação constitutiva de JAK2, fosforilação constitutiva do fator STAT5, além da indução de transcrição dependente de STAT5 na ausência de EPO (MONTE-MOR, 2008). Há ainda o gene LNK (A300V, V402M, R415H), uma proteína adaptadora que rege negativamente a via de sinalização da JAK2/STAT. Foi observado sua correlação com as síndromes mieloproliferativas crônicas com a presença ou não da associação com a JAK2V617F (CHEN et al., 2016).

Figura 2. Esquematização do funcionamento da JAK2



Fonte: SIGNORINO (2011)

Existem ainda outras mutações que podem levar a PV, como uma alteração no éxon 12 do JAK2, envolvendo substituição, duplicação e deleção de nucleotídeos

(SPIVAK; SILVER, 2008). Além da hiperproliferação da MO, alguns pacientes possuem alteração cromossômica como: 20q-, trissomia dos cromossomos 8, 9 e 13q, podendo ser utilizados como marcadores citogenéticos como forma de diagnóstico complementar (AMARAL, 2008; HAMERSCHLAK, 2008).

As translocações recíprocas levam à fusão de genes e produção de proteínas quiméricas. As mutações pontuais da quinase JAK2 ocorrem em quase todos os PV. JAK2 funciona como a jusante dos receptores de membrana, incluindo receptores de citocinas tais como os receptores de interleucina-3 (IL3). A superprodução de IL3 foi relatado na leucemia mieloide crônica atípica após reordenamentos da região ativa do gene IL3 em células de pacientes com t(5; 12)(q23-31; p13) translocação e fusão ETV6-ACSL6. Foram reportados em estudo dois casos de t(5;12)(q23-31;p13) translocação com rearranjo ETV6-ACSL6 em pacientes com policitemia vera (MURATI, 2006).

A evolução da doença é heterogênea indicando a ocorrência de fenômenos adicionais, expandindo-se a instabilidade genômica e promovendo a leucemogênese. É relatado duas formas de progressão da síndrome, a primeira leva à LMA, na qual uma determinada classe de mutação leva vantagem proliferativa (JAK2V617F), e na segunda ocorre o bloqueio de diferenciação hematopoiética (deleção 20q) (RIBEIRO et al., 2009).

Devido as diversas suspeitas gênicas na qual as mutações derivadas das neoplasias estão envolvidas foi realizado um estudo na Espanha para análise de 16 polimorfismos de nucleotídeos únicos de pacientes com PV e TE, localizados em 12 genes envolvidos no reparo do DNA ou na manutenção do comprimento dos telômeros. Os polimorfismos foram selecionados entre aqueles com alta heterocigosidade e evidências científicas anteriores para sua potencial associação com susceptibilidade ao câncer humano. Os polimorfismos de nucleotídeos que poderiam estar relacionados foram os seguintes: XPD (rs13181), ERCC3 (rs4662717), ERCC4 (rs3136155), ERCC6 (rs3793784), ERCC8 (rs3117), RPA1 (rs2287321), RPA2 (rs7356), RPA3 (rs6945447), XPA (rs2808668), XPC (rs2228000, rs2228001), XRCC1 (rs25487), TERT (rs2853669, rs2736098, rs2853677, rs2736100). A análise de genotipagem dos SNPs foi realizada por PCR em tempo real, utilizando os ensaios *TaqMan SNP Genotyping on demand*, comercializados pela *Applied Biosystems*. Apesar disso nenhum dos genes manteve relação com os carcinomas (GÓMEZ, 2016).

A atuação dos microRNAs contribuem para a patologia das síndromes neoplásicas, estes são uma grande classe de não-codificando 18-22 nt RNAs que atuam como reguladores pós-transcrição da expressão gênica. Os miRNAs desregulados foram identificados em pacientes com MPNs em células de sangue periféricas, algumas das quais possuem padrão de expressão dependente de JAK2. Em estudo realizado o miR-125 foi selecionado para investigação com objetivo de avaliar a expressão diferencial de miRNA-125 em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV com aqueles obtidos de indivíduos saudáveis de controle; para investigar a correlação entre a expressão de miARN e a carga de alelos JAK2 V617F; e estabelecer certos marcadores para investigar as diferenças moleculares entre essas doenças (FERDOWSI, 2015).

A expressão excessiva de miR-125a ou miR-125b aumenta consideravelmente o pool e a produção de células estaminais hematopoiéticas e pode induzir neoplasias mieloproliferativas em camundongos. O miR-125 é regulado positivamente em uma variedade de leucemias humanas, incluindo mielodisplasia e LMA portadoras da translocação t (2; 11), LMC, leucemia megacariocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda da infância (LLA) com a proteína de fusão ETV6 / Runx1, leucemia linfoblástica aguda da criança com precursor das células B de Philadelphia e leucemia promielocítica aguda (LPA) (FERDOWSI, 2015; ZHANG B, 2007).

Por outro lado, relatórios recentes indicaram que as proteínas tirosinafosfatases PTPN18 e PTPN7 e as fosfatases de serina/treonina PPP1CA e PPP2CA são alvos centrais para a função oncogênica de miR-125b *in vivo* e o aumento da expressão de miR-125 pode levar a hipersensibilidade de citocinas de progenitores hematopoiéticos da medula óssea, o que resulta em um estado pré leucêmico. A expressão de JAK2V617F em linhas celulares dependentes de citocinas também confere hipersensibilidade a citocinas (FERDOWSI, 2015; SHENOUDA, 2009).

Foram obtidas informações valiosas sobre os papéis de outros miRNAs na patogênese das neoplasias, por exemplo, miR-150, miR-451, miR-145, miR28, miR-133a, miR-16-2, miR-433, miR-182 e miR-145 miR143 que de acordo com estudos anteriores revelam que a carga de alelos do JAK2 V617F difere entre as SMPs, resultando maior em policitemia vera em relação a trombocitemia essencial. Em conclusão, os achados da expressão de miR-125 aberrante indicam que outros fatores podem influenciar o fenótipo da doença em pacientes com PV (FERDOWSI, 2015).

Antes de 2008, o diagnóstico molecular não fazia parte do painel de diagnóstico de rotina para PV e também não fazia parte dos critérios diagnósticos da OMS. A maioria dos pacientes tinha de ser diagnosticada de acordo com os critérios da World Health Organization 2001 (BARBUI, 2015). O estado molecular destes pacientes, no entanto, obviamente não foi reavaliado após a revisão dos critérios da OMS em 2008. Para pacientes diagnosticados e seguidos na última década, o estado molecular teve grande importância e foi relatado em mais de 90% dos casos e, portanto a caracterização molecular, pode ser considerado parte do exame de rotina de diagnóstico (JENTSCH-ULLRICH, 2016).

3.1.5 Diagnóstico de Policitemia Vera

O diagnóstico para a PV é obtido por meio de critérios de exclusão, sendo identificados como maiores e menores. Os critérios maiores são: cariótipo anormal, dosagem de hemoglobina elevada, presença de JAK2 V617F ou mutação similar, total de hemácias com 25% acima do valor de referência. E os critérios menores são: hiperplasia das três linhagens na medula óssea, eritropoetina sérica acima do normal, presença de colônia eritróide endógena crescida. Para fechamento do diagnóstico torna-se necessário a presença de dois critérios maiores e um critério menor, ou um critério maior e dois critérios menores (BOYIADZIS et al., 2007; AMARAL, 2008).

No diagnóstico primário os pacientes recebem terapia antitrombótica com ácido acetilsalicílico. Em relação à terapia citorrredutiva, a maioria dos pacientes é tratada com flebotomia e fazem uso da hidroxureia para completar a citorredução. Apenas alguns pacientes são tratados com interferon ou terapia com inibidor de JAK. Também foram relatados casos raros de esplenectomia e a irradiação do baço no caso dos pacientes não receberam nenhum tipo de tratamento (JENTSCH-ULLRICH, 2016).

Em pacientes com PV, a flebotomia realizada com um valor de hematócrito (Hct) inferior a 45% resultou em uma taxa significativamente mais baixa de morte cardiovascular e trombose principal em comparação com aqueles que tiveram um hematócrito de 45 a 50 %. Em um editorial acompanhante, Spivak(2013) enfatizou a importância da flebotomia guiada pelo valor do (Hct), porém ajustado para gênero. Uma grande maioria dos pacientes com PV regularmente flebotomizados, são ou se

tornam dependentes de ferro. Portanto, somente o exame do Hct apenas pode produzir uma interpretação errônea quanto à necessidade de flebotomia (SILVER; GJONI, 2015).

Curiosamente, mesmo na era moderna, continua a haver alguma controvérsia quanto à definição de eritrocitose absoluta, seja por hemoglobina, hematócrito ou teste de massa de células vermelhas nucleares, potencialmente levando ao subdiagnóstico de PV. Além da identificação de mutações JAK2, avanços importantes na última década afetaram a PV, incluindo um ensaio clínico que apoia o uso de aspirina, validação do alvo de hematócrito para flebotomia e ressurgimento de interferon alfa (PEG-IFN- α) como uma possível opção de tratamento (STEIN, 2014).

O padrão-ouro para terapia é a flebotomia sistemática. Em casos refratários, é utilizado fósforo radioativo. No entanto, a terapia radioativa traz seus próprios efeitos colaterais. O *Plasmodium knowlesi* é um parasito com tropismo por eritrocitos, semelhante aos vírus oncolíticos que entram em um tipo de célula tumoral histolítica específica e expressam receptores de entrada bem definidos. Foi sugerido por pesquisadores como um tratamento parasítico oncolítico inovador do século 21, porém ignorado por médicos. O tratamento à base de parasito pode ser administrado por injeção intravenosa do *P. knowlesi* cultivado conforme necessário e não é patogênico para humanos. O parasita infecta as hemácias e causa febre alta, após poucos ciclos de replicação de 24 horas, auto-termina sem nenhum tratamento. (RIZVI et al, 2015).

3.1.6 Fluxograma do diagnóstico molecular

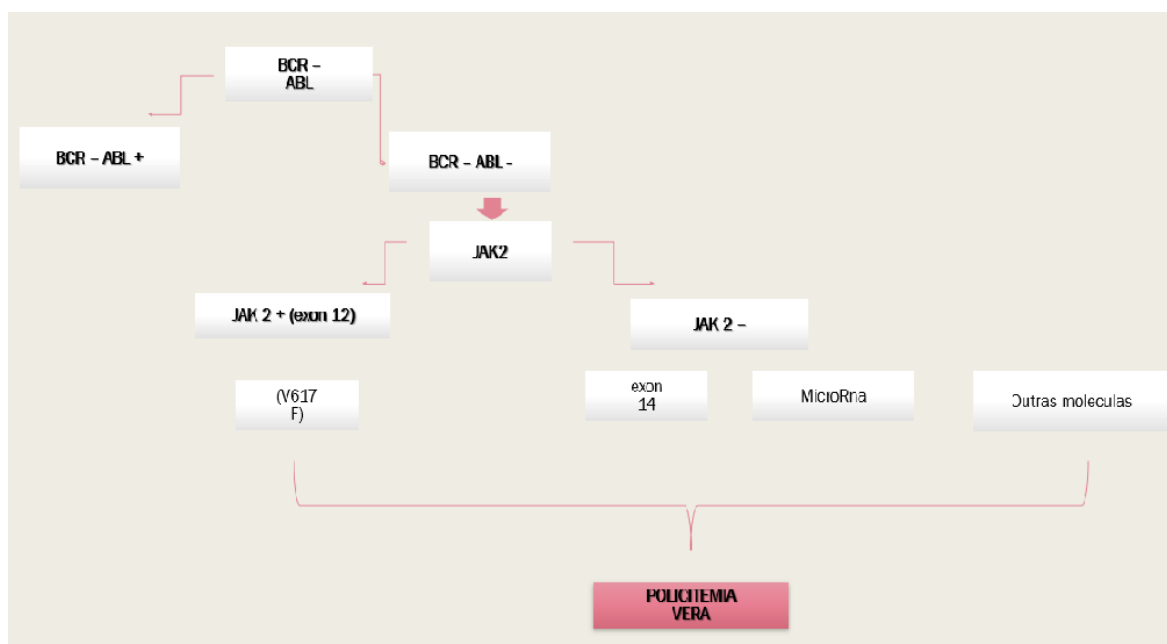
O início do rastreio para identificação da policitemia vera baseia-se na cariotipagem negativa na busca da presença do cromossomo Philadelphia e na pesquisa molecular pelo gene híbrido BCR-ABL. A partir desse marcador molecular, as SMPCs são divididas em dois grandes grupos: as BCR-ABL positivas (cromossomo Filadélfia positivo) e BCR-ABL negativas (cromossomo Filadélfia negativo). A ausência do BCR-ABL positivo leva a procura de outras anormalidades, como a presença de JAK2 positiva para caracterização das demais síndromes. (MARTINS, 2016)

Assim, em casos de BCR-ABL negativo, a busca pela mutação na JAK2 torna-se um excelente marcador molecular, também dividindo àquelas que são JAK positivas para a mutação JAK2V617F daquelas JAK2 negativas para essa mesma

alteração. Entre as JAK2 positivas encontra-se distribuídos a maior parte dos casos de PV. Assim, no grande grupo das denominadas JAK2+ ocorre uma mutação pontual que altera a codificação dessa proteína, promovendo a sua autofosforilação constitutiva e também do fator STAT5 na ausência de eritropoetina. Pode-se encontrar ainda a correlação do gene LNK com a presença ou não da associação com a JAK2V617F. Quando a Policetemia Vera é negativa para JAK2V617F pode se considerar uma alteração no éxon 12 da JAK2, englobando a substituição, duplicação ou substituição de nucleotídeos. O diagnóstico desse grande grupo é em sua grande maioria das vezes feito por critérios de exclusão estabelecidos segundo OMS (MARTINS, 2016; SILVER, 2008).

Sabe-se que pelas diversas características sintomatológicas que a PV não está somente associada à JAK2, pode haver a correlação de microRnas dentre outras moléculas contudo pouco esclarecidas na literatura (FERDOWSI, 2015).

Figura 1. Fluxograma para a caracterização molecular de PV



Fonte: Autoria Própria, 2017

4. Considerações Finais

A desregulação gênica tem um papel importante para propiciar distúrbios neoplásicos mieloproliferativos. Desde então, muitos estudos já relataram a presença

de inúmeras alterações no DNA capazes de gerar uma desordem gênica alterando as vias de sinalização da proliferação celular normal culminando em um processo clonal crônico. Atualmente, com o avanço da tecnologia em biologia molecular e o alavancar na área do diagnóstico molecular muito enfoque tem sido dado em busca de alterações gênicas que possam elucidar doenças malignas a fim de gerar uma precisão no diagnóstico, fato que infere diretamente sobre o prognóstico e qualidade de vida do paciente.

A presença da JAK2 positiva é característica de PV, tornando assim a busca pela sua mutação um excelente marcador molecular. Dessa forma, ocorre uma mutação pontual que altera a codificação dessa proteína, promovendo a sua autofosforilação constitutiva e também do fator STAT5 na ausência de eritropoetina. Quando a Policitemia Vera é negativa para JAK2V617F pode se considerar uma alteração no éxon 12 da JAK2, englobando a substituição, duplicação ou substituição de nucleotídeos. Porém apesar de ser primordial para síntese da doença há outros fatores gênicos que influenciam seu prognóstico. O diagnóstico é em sua grande maioria das vezes feito por critérios de exclusão estabelecidos segundo padrões da OMS.

A análise documental demonstra que a Policitemia vera apresenta características fisioclínico-patológicas pouco expressivas para um diagnóstico clínico, sendo a presença de marcadores moleculares importante para um diagnóstico mais específico e confiável. As síndromes mieloproliferativas crônicas de uma forma em geral não partilham das mesmas mutações, responsáveis essas pelas individualidades e particularidades de cada distúrbio, como descrito exclusivamente da Policitemia Vera. Os resultados corroboram com pesquisas anteriores uma vez que esclarecem a importância molecular e genética na caracterização de cada uma das patologias com a finalidade de promover um diagnóstico mais claro, amplo, específico e seguro. Observou-se também a relevância da caracterização gênica a partir de moléculas que quando presentes se associam a um perfil clínico diferenciado.

5. Referências

BALASUBRAMANI, A; et al. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. **Nature Communications**. England, n.6, p. 7307, June 22, 2015.

BARBUI, T. How to manage thrombosis in myeloproliferative neoplasms. **Current Opinion in Oncology**, Philadelphia, v. 23, n. 6, p. 654-658, nov. 2011.

BOYIADZIS, M; FRAME, J; KOHLER, D; FOJO, T. Hematology-oncology Therapy, 2 ed. USA: New York, **Mc Graw Hill**, 2007

BUZZAS, C. et al. Budd Chiari syndrome secondary to polycythemia vera, **Journal of gastrointestinal and liver diseases**, Romenia,v.18, n. 3, p. 363-366, 2009.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 308-316, jul./ago. 2010.

CHEN, Y. et al. The Polymorphisms in LNK Gene Correlated to the Clinical Type of Myeloproliferative Neoplasms. **Plos one**, v.11, n.4, s.p., Aug. 2016.

FERDOWSI, S; et al. Expression analysis of microRNA-125 in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia and correlation with JAK2 allele burden and laboratory findings. **International Journal Of Laboratory Hematology. England**, v. 37, n. 5, p. 661-667, Oct. 2015.

FERNANDES, A. **Hématopoïèse**. 2015. Disponível em: <http://know.net/fr/sciences-terre-vie/biologie/hematopoiese/>. Acesso em: 13 dez. 2017.

GÓMEZ, M; et al. Risk factors for non-melanoma skin cancer in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. **European Journal Of Haematology**. Inglaterra, v. 96, n. 3, p. 285-290, Mar. 2016.

GRIESSHAMMER, M. et al. Essencial thrombocythemia - clinical significance, diagnosis and treatment. **Dtsch Arztebl Internacional**, Cologne, v. 104, n. ,p. 34-35, 2007.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 84, n. 4, p. 52-57, 2008.

JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constutive signalling causes polycithaemia vera. **Nature**, London, v. 434, n. 4037, p.1144-1148, apr. 2005.

JAMES, C. The JAK2V617 mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases. **American Society of Hematology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 69-75, 2008.

JENTSCH-ULLRICH, K; et al. Characteristics and treatment of polycythemia vera patients in clinical practice: a multicenter chart review on 1476 individuals in Germany. **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**. Germany, v.142, n. 9, p. 2041-2049, Sept. 2016.

LEE, G; ARCASORY, M, The clinical and laboratory evaluation of the patient with erythrocytosis. **European Internacional Journal**, v.26, p.297-302, 2015

LEVINE, R. L.; GILLILAND, G. Myeloproliferative disorders. **American Society of America**, Washington, v. 112, n. 6, p. 2190-2197, 2008.

MICHIELS, J. J et al. The paradoxi of platelet activation and impaired fuction: plateletvon willebrand fator interactions, and the etiology of thrombocythemia and polycethemia vera. **Semin Thromb Hemost**. p.589-604, 2006.

MONTE-MÓR, B. C. R.; COSTA, F. F. A mutação JAK2 V617F e as síndromesmieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo,v. 30, n. 3, p. 241-248, maio/jun. 2008.

MURATI, A. et al. t(5;12)(q23-31;p13) with ETV6-ACSL6 gene fusion in polycythemia vera. **Leukemia**. England, v. 20, n. 6, p. 1175-1178, June 2006.

NORD. The physician's guide to myelofibrosis. Disponível em: <nordphysicianguides.org/myelofibrosis/>. Acesso em: 12 de out. 2017.

RIBEIRO J et al. Duas classes de mutação na evolução de Policetemia vera para leucemia mieloide aguda. **Revista brasileira de hemoterapia e hematologia**, São Paulo, v. 31, n.2, p.115-117, 2009.

RIZVI, ST; BAGASRA, O. An oncolytic parasite to treat polycythemia vera. **The Libyan Journal Of Medicine**. United States, v. 10, n. 1, p. 300-303, Nov. 2015.

SHENOUDA, S. K.; ALAHARI, S. K. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? **Cancer and Metastasis Reviews**, New Orleans, v. 28, n. 3-4, p. 369-378, Dec. 2009.

SIGNORINO, E. **Polycythemia Vera**. 2011. Disponível em: <http://flipper.diff.org/app/items/3740>. Acesso em: 13 dez. 2017.

SILVER, R. T.; GJONI, S. The hematocrit value in polycythemia vera: caveat utilitor. **Leukemia & Lymphoma**, London, v. 56, n. 5, p. 1540-1541, May 2015.

SPIVAK, J. L.; SILVER, R. T. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. **American Society of American**, Washington, v. 112, n. 2, p. 231-239, 2008.

STEIN, BL; MOLITERNO, AR; TIU, RV. Polycythemia vera disease burden: contributing factors, impact on quality of life, and emerging treatment options. **Annals Of Hematology**, Alemanha, v. 93, n. 12, p. 1965-1976, Dec. 2014.

TEFFERI, A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Jornal of Clinical Oncology**, Rochester, v.23, 2005

TEFFERI, A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. **Leucemia Society of America**, Baltimore, v. 22, p. 3-13, 2008.

VAKIL, E; TEFFERI, A. BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasm: a review of molecular biology, diagnosis, and treatment. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 11, n. 1, mai. 2011.

VASSALLO, J.; MAGALHÃES, S. M. M. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 267-272, 2003.

ZHANG B et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Developmental biology**, Texas, v. 302, n. 1, p. 1-12, Feb. 2007.