

Estudo da mutação V617F-*JAK2* em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico, trombose venosa cerebral, trombose da veia porta e síndrome de Budd-Chiari

**Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica
Área de Concentração: Hematologia
Nível: Doutorado
Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

Setembro, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ESTUDO DA MUTAÇÃO V617F-JAK2 EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO, TROMBOSE VENOSA CEREBRAL, TROMBOSE DA VEIA PORTA E SÍNDROME DE BUDD-CHIARI

Sandra Guerra Xavier

Orientadores:

Prof. Dr. Nelson Spector

Dra. Ilana Zalberg Renault

Prof. Dra. Telma Barbosa Gadelha

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Medicina.

Aprovada em _____ de _____ de _____.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Nelson Spector

Prof. Dr. Angelo Maiolino

Dr. Martin Hernan Bonamino

Prof. Dra. Nelma Cristina Diogo Clementino

Prof. Dra. Suely Meireles Rezende

Rio de Janeiro

Setembro, 2009

Xavier, Sandra Guerra

Estudo da mutação V617F-JAK2 em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico, trombose venosa cerebral, trombose da veia porta e Síndrome de Budd-Chiari / Sandra Guerra Xavier. Rio de Janeiro, UFRJ, Faculdade de Medicina, 2009.

xv, 85 p., il.

Orientadores: Nelson Spector, Ilana Zalberg Renault e Telma Barbosa Gadelha.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina / Pós-graduação em Clínica Médica, 2009.

1. Doença mieloproliferativa crônica. 2. Trombose. 3. Acidente vascular encefálico isquêmico. 4. Trombose venosa cerebral. 5. Trombose da veia porta. 6. Síndrome de Budd-Chiari. 7. Gene JAK2. 8. Mutação V617F-JAK2. 9. Hematologia – Tese. I. Spector, Nelson. II. Renault, Ilana Zalberg. III. Gadelha, Telma Barbosa. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Pós-graduação em Clínica médica. IV. Título

Ao meu pai, com muita saudade.

Gostaria de agradecer a todos que foram muito importantes para a realização deste trabalho:

Ao meu pai, Luiz, que dedicou sua vida para que momentos como esse fossem possíveis.

À minha mãe, Aida, que sempre apoiou incondicionalmente todas as minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Sérgio e Marcelo, pelo companheirismo e bom humor.

Ao Fernando, o mais necessário, pela cumplicidade, doçura, diversão, entusiasmo, por tudo.

À Zezé, pelo carinho, bom humor e estímulo permanente.

Ao Zé Carlos, que estará sempre presente como exemplo de busca incessante pelo conhecimento.

Ao Nelson, pelo exemplo de compromisso com a formação acadêmica e humana e pelo suporte constante, fundamental à realização deste trabalho.

À Ilana, pela oportunidade e incentivo para realizar este trabalho e pelo suporte científico e logístico.

À Telma, pelo suporte científico e imensa colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Ao Martin, pela ajuda e discussões sempre interessantes.

Ao Evandro, o responsável pelo impulso inicial.

À Nelma, pelo incentivo constante e dedicação fundamental à realização deste trabalho.

Ao Daniel, pela paciência, ricas discussões e essencial participação em várias etapas deste trabalho.

A Danilo, Valéria e Cybele, pelo estímulo, disponibilidade, paciência e colaboração diária.

Aos colegas do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Faculdade de Farmácia, Adriano, Ana Paula e Sabrina, pela grande colaboração com os dados e material dos pacientes da UFMG.

À Juliana, do setor de Genética do Laboratório Geraldo Lustosa, pela cooperação com as análises moleculares.

Ao Rony e Luciana Britto, pela ajuda essencial à realização deste trabalho.

À Glicínia, pelo incentivo e imensa colaboração em várias etapas deste trabalho.

A Angela, Marília e Juliane, pela inestimável colaboração com os dados dos pacientes do Fundão.

À equipe do Laboratório de Hemostasia do HUCFF, Gizele Castro, Débora e Gizele, pela disponibilidade e grande colaboração.

À Teresa Gouda, pela grande ajuda ao longo deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do CEMO-INCa, em especial Telma, Virgínia, Ana Paula e Fernandinha, pela disponibilidade, paciência e ajuda.

A Rocío e Gustavo, pela ajuda e incentivo.

Às amigas do Inácio, pelo grande incentivo.

A Suzane, Silvana, Tiza e Teresa, pelo estímulo permanente.

A Suely, Pedro e Henrique, pelo incentivo e sugestões interessantes.

À Rosa Malena, pela grande colaboração ao longo deste trabalho.

E, de maneira muito especial, agradeço:

À Jo, pela amizade, ajuda irrestrita, paciência, incentivo e por tantas coisas compartilhadas.

A Luísa, Rosa e Riba, pelo carinho e apoio.

À Bete, pelo carinho, incentivo constante e apoio fundamental em tantos momentos.

A Irene, Philippe, Sr. Márcio e D. Elvandar, pela recepção tão carinhosa.

Ao Eduardo, pela imensa disponibilidade e ajuda inestimável.

O senhor... Mire veja:
o mais importante e bonito, do mundo, é isto:
que as pessoas não estão sempre iguais,
ainda não foram terminadas
— mas que elas vão sempre mudando.
Afinam ou desafinam.
Verdade maior.
É o que a vida me ensinou.
Isso que me alegra, montão.

Guimarães Rosa, "Grande sertão: veredas"

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
II.1. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS.....	3
II.2. O GENE JAK2.....	5
II.3. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NAS NMPs.....	8
II.3.1. A mutação V617F-JAK2.....	8
II.3.2. Métodos para a detecção da V617F-JAK2.....	10
II.3.3. Impacto da V617F-JAK2 no fenótipo e no prognóstico das NMPs.....	13
II.3.4. O papel da carga alélica da V617F-JAK2.....	13
II.3.5. Impacto da V617F-JAK2 na classificação e abordagem das NMPs.....	15
II.3.6. Outras mutações do gene JAK2 e mutações do gene MPL.....	19
II.4. COMPLICAÇÕES TROMBÓTICAS NAS NMPs.....	20
II.4.1. Acidente vascular encefálico isquêmico nas NMPs.....	21
II.4.2. Trombose venosa nas NMPs.....	22
II.4.3. Fatores de risco para trombozes nas NMPs.....	25
II.5. MUTAÇÃO V617F-JAK2 E TROMBOSE.....	26
III. OBJETIVOS.....	30
III.1. OBJETIVOS GERAIS.....	30
III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
IV. PACIENTES E MÉTODOS.....	31
IV.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	31
IV.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	31
IV.2.1. Pacientes com AVEi ou TVC.....	31
IV.2.2. Pacientes com trombose venosa esplâncnica.....	32
IV.3. MÉTODOS.....	33
IV.3.1. Tipo de estudo.....	33
IV.3.2. Definições.....	33
IV.3.3. Métodos estatísticos.....	34

IV.3.4. Estudo laboratorial.....	35
V. RESULTADOS.....	40
V.1. PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS BASEADOS NA PCR.....	40
V.1.1. AS-PCR para a detecção da V617F-JAK2.....	40
V.1.2. ARMS-PCR para a quantificação alélica dos pacientes com a V617F-JAK2.....	41
V.2. PACIENTES COM AVEi OU TVC.....	44
V.2.1. Características gerais.....	45
V.3.2. Pacientes com AVEi e com a V617F-JAK2.....	45
V.3. PACIENTES COM TROMBOSE VENOSA ESPLÂNCNICA.....	46
V.3.1. Características gerais.....	47
V.3.2. Descrição dos pacientes com TVE e com a V617F-JAK2.....	49
VI. DISCUSSÃO.....	53
VII. CONCLUSÕES.....	62
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
IX. ANEXOS.....	86
ANEXO 1. FICHA CLÍNICA UFRJ.....	86
ANEXO 2. FICHA CLÍNICA UFMG.....	98
ANEXO 3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO UFRJ.....	99
ANEXO 4. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO UFMG.....	101
ANEXOS 5 e 6. ARTIGOS PUBLICADOS.....	104

TABELAS

Tabela 1: Classificação proposta pela OMS em 2001 para as doenças mieloproliferativas crônicas.....	15
Tabela 2: Critérios propostos em 2001 pela OMS para o diagnóstico da policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária.....	16
Tabela 3: Classificação proposta pela OMS em 2008 para as doenças neoplásicas mielóides.....	17
Tabela 4: Critérios propostos pela OMS em 2008 para o diagnóstico da policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária.....	18
Tabela 5: Características principais dos estudos que analisaram a V617F-JAK2 em pacientes com trombose de veias esplâncnicas ou cerebrais.....	28
Tabela 6: Características principais dos estudos que analisaram a V617F-JAK2 em pacientes com AVEi, IAM, trombose arterial periférica ou com trombose venosa de outras localizações.....	29
Tabela 7: Características demográficas dos 222 pacientes com AVEi ou TVC incluídos no estudo.....	45
Tabela 8: Características demográficas, fatores de risco protrombóticos e status mutacional para a V617F-JAK2 dos 108 pacientes com TVE.....	48
Tabela 9: Características dos pacientes com e sem a mutação V617F-JAK2.....	49
Tabela 10: Características dos 24 pacientes com a mutação V617F-JAK2.....	50

FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura das JAKs.....	6
Figura 2: Representação esquemática da via JAK-STAT.....	7
Figura 3: Papel da JAK2 nas vias de sinalização relacionadas ao receptor de eritropoietina e efeito da mutação V617F-JAK2.....	9
Figura 4: AS-PCR para a detecção da V617F-JAK2.....	37
Figura 5: ARMS-PCR para a detecção da V617F-JAK2.....	39
Figura 6: Detecção da V617F-JAK2 por AS-PCR.....	40
Figura 7: Limite de detecção da AS-PCR para a V617F-JAK2 – Curva de diluição.....	40
Figura 8: Padronização da ARMS-PCR para a V617F-JAK2 – Curva de diluição.....	42
Figura 9: Representação esquemática da casuística.....	44
Figura 10: Representação esquemática dos resultados dos pacientes com trombose esplâncnica.....	52

ABREVIATURAS

AVE	Acidente vascular encefálico
AVEi	Acidente vascular encefálico isquêmico
ARMS-PCR	<i>Amplification refractory mutation system-PCR</i> – Reação em cadeia da polimerase baseada no sistema de mutação refratário à amplificação
AS-PCR	<i>Allele-specific PCR</i> – Reação em cadeia da polimerase alelo-específica
BMO	Biópsia de medula óssea
CEE	Colônias eritróides endógenas
DMPCs	Doença mieloproliferativa crônica
ECLAP	<i>European Collaboration on low-dose aspirin in polycythemia vera</i> – Estudo colaborativo europeu para avaliação de baixa dose de aspirina na policitemia vera
EPO	Eritropoietina
EPOR	Receptor de eritropoietina
IAM	Infarto agudo do miocárdio
JAK2	<i>Janus kinase 2</i> – cinase Janus 2
JH	<i>JAK homology</i> – domínio homólogo JAK
LMC	Leucemia mielóide crônica
MO	Medula óssea
MP	Mielofibrose primária
NMP	Neoplasia mieloproliferativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PV	Policitemia vera
PVSG	<i>Polycythemia vera Study Group</i> – Grupo de estudo em policitemia vera
SBC	Síndrome de Budd-Chiari
SMD	Síndrome mielodisplásica
STATs	<i>Signal transducers and activators of transcription</i> – Transdutores de sinais e ativadores de transcrição
TC	Tirosina cinase
TE	Trombocitemia essencial
TEP	Tromboembolismo pulmonar

TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i> – Ensaio Clínico Org 10172 no Tratamento do Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Agudo
TP	Trombose da veia porta
TVC	Trombose venosa cerebral
TVE	Trombose venosa esplâncnica
TVP	Trombose venosa profunda
V617F-JAK2	Mutação V617F da cinase Janus 2

RESUMO

Introdução: Os fenômenos trombóticos estão entre as complicações mais comuns e graves nos pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMPs). Adicionalmente, trombozes em locais não-habituais como as veias esplâncnicas e cerebrais ocorrem nestes pacientes com maior frequência. A mutação V617F-*JAK2* foi recentemente identificada como um evento patogênético crucial, bem como uma ferramenta diagnóstica de grande utilidade nas NMPs. O objetivo deste estudo foi estabelecer a prevalência da V617F-*JAK2* em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico, trombose venosa cerebral ou trombose venosa esplâncnica.

Métodos: Foram estudados retrospectivamente 178 pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico, 44 com trombose venosa cerebral e 108 com trombose de veia porta (n=77) e síndrome de Budd-Chiari (n=31), encaminhados a laboratórios de hemostasia para avaliação de risco trombótico.

Resultados: A V617F-*JAK2* foi identificada em 2/178 (1%) pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico, ambos de etiologia indeterminada, e em 24/108 (22%) pacientes com trombose venosa esplâncnica, incluindo dois cirróticos. Nenhum dos pacientes com trombose venosa cerebral apresentou a mutação. Dentre os pacientes com trombose esplâncnica, 63% apresentaram um ou mais fatores de risco protrombóticos. A V617F-*JAK2* foi detectada nos quatro pacientes com diagnóstico prévio de NMP e, em nove pacientes, esse diagnóstico foi feito durante a investigação da trombose, durante o seguimento ou por ocasião do estudo, após a identificação da mutação. Dentre os pacientes sem NMP (n=99), 15 (15%) apresentaram a mutação. Nenhum dos pacientes V617F-*JAK2*-negativos desenvolveu evidências de NMP durante um seguimento mediano de 51 meses (1–104 meses).

Conclusões: Nossos resultados sugerem que a V617F-*JAK2* é rara em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico ou trombose venosa cerebral sem evidências

clínico-laboratoriais de NMP. Além disso, nossos achados mostram que a V617F-*JAK2* é frequente em pacientes com trombose venosa esplâncnica, incluindo pacientes cirróticos, reforçando a utilidade clínica de sua pesquisa nesse contexto.

ABSTRACT

Background: Thrombotic complications are a main concern in patients with myeloproliferative neoplasms. These patients have a particularly high rate of thromboses of unusual sites like splanchnic or cerebral veins, which can be the presenting manifestation of the myeloproliferative neoplasm. The aim of this study was to determine the frequency of the *JAK2V617F* in patients with ischemic stroke, cerebral vein thrombosis and splanchnic vein thrombosis.

Methods: A consecutive series of 178 patients with ischemic stroke, 44 with cerebral vein thrombosis and 108 patients with portal vein thrombosis (n=77) and Budd-Chiari syndrome (n=31) referred for hemostasis evaluation was retrospectively studied.

Results: The *JAK2V617F* was found in 2/178 (1%) patients with ischemic stroke, both of undetermined etiology, and in 24/108 (22%) patients with splanchnic thrombosis, including two cirrhotic patients. None of the 44 patients with cerebral vein thrombosis presented the mutation. Among the patients with splanchnic thrombosis, one or more prothrombotic risk factors were present in 63%. *JAK2V617F* was present in all four with a previous diagnosis of a myeloproliferative neoplasm, and in nine patients, the diagnosis of a myeloproliferative neoplasm was made at the thrombosis work-up, during follow-up or after *JAK2V617F* detection. Among the patients without an overt myeloproliferative neoplasm, 15 out of 99 (15%) presented the *JAK2V617F* mutation. None of the *JAK2V617F*-negative patients with splanchnic thrombosis have developed signs of a myeloproliferative neoplasm during follow-up.

Conclusions: Our findings suggest that *JAK2V617F* is rare in patients with ischemic stroke or cerebral vein thrombosis. Besides, our data suggest that *JAK2V617F* occurs in a high proportion of patients with splanchnic vein thrombosis, including cirrhotic patients, and reinforces its diagnostic utility in this setting.

I. Introdução

O termo “doenças mieloproliferativas crônicas”, mais recentemente substituído por “neoplasias mieloproliferativas”,¹ refere-se a um conjunto heterogêneo de doenças clonais, caracterizadas pela independência ou hipersensibilidade de progenitores hematopoiéticos a diversas citocinas. O resultado é a produção excessiva de uma ou mais linhagens hematopoiéticas, associada a um risco de complicações trombóticas, hemorrágicas e, mais raramente, transformação fibrótica ou leucêmica.²

As principais neoplasias mieloproliferativas são a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE), a mielofibrose primária (MP) e a leucemia mielóide crônica (LMC).³

Embora a patogênese da LMC seja reconhecidamente atribuída à tirosina cinase BCR-ABL, resultado da t(9;22)(q34;q11),⁴ pouco se conhecia sobre a patogênese molecular das neoplasias mieloproliferativas (NMPs) BCR-ABL-negativas. Em 2005, alguns grupos demonstraram, por diferentes metodologias, a ocorrência de uma mutação de ponto que resulta na substituição de um resíduo de valina na posição 617 por um resíduo de fenilalanina (V617F) e leva à atividade constitutiva da tirosina cinase JAK2.⁵⁻⁸ A mutação V617F-JAK2 foi observada em quase todos os pacientes com PV e em cerca da metade dos pacientes com TE e MP.⁹

A descoberta da V617F-JAK2 propiciou um grande avanço no diagnóstico e na caracterização das NMPs, e abriu novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas a estas doenças.

Com a realização de grandes estudos de acompanhamento de pacientes com NMPs, ficou claro que os fenômenos trombóticos arteriais e venosos estão entre as complicações mais comuns e graves.^{10,11} Estudos recentes observaram uma correlação entre a presença da V617F-JAK2 e a ocorrência de fenômenos trombóticos nos pacientes com NMPs.^{12,13} Por esse motivo, houve interesse

imediatamente no estudo da prevalência da mutação em pacientes com tromboembolias de sítios diversos.

Os resultados dessas investigações apontaram para uma alta prevalência da V617F-JAK2 em pacientes com trombose venosa esplâncnica sem sinais de NMP, sugerindo que sua pesquisa seja incorporada à rotina diagnóstica nesse contexto.¹⁴ O cenário para as tromboembolias arteriais e tromboembolias venosas de outras localizações é bem diferente, já que a mutação foi ausente ou raramente observada nas séries estudadas.^{15,16}

Os acidentes vasculares encefálicos isquêmicos representam os principais eventos trombóticos nas NMPs e constituem a maior causa de morte em pacientes com PV não-tratados.^{17,18} Tromboembolias de localizações não-usuais, tais como as de veias esplâncnicas e cerebrais, ocorrem em pacientes com NMP com particular frequência.¹⁹

O objetivo do presente estudo foi estabelecer a prevalência da mutação V617F-JAK2 em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico, trombose venosa cerebral ou trombose venosa esplâncnica (trombose da veia porta e síndrome de Budd-Chiari) e, assim, avaliar a utilidade da sua pesquisa na investigação diagnóstica de NMPs latentes nesses pacientes.

II. Revisão da literatura

II.1. Neoplasias mieloproliferativas

As neoplasias mielóides podem ser categorizadas em dois grandes grupos: as leucemias mielóides agudas e as doenças mielóides crônicas, que por sua vez incluem subcategorias de doenças mieloproliferativas e mielodisplásicas.³

O termo “doenças mieloproliferativas crônicas” (DMPCs) foi introduzido por William Dameshek, em 1951,²⁰ com base na observação das semelhanças clínicas entre a leucemia mielóide crônica (LMC), a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE), a mielofibrose idiopática (MI) e a eritroleucemia. A eritroleucemia foi redefinida posteriormente como leucemia eritróide aguda e suas variantes.³

Desde a definição de Dameshek, as DMPCs incluem quatro entidades clínico-patológicas consideradas clássicas: a PV, a TE, a MI, agora denominada mielofibrose primária (MP), e a LMC. A Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu ainda neste grupo entidades mais raras como a leucemia neutrofílica crônica, a leucemia eosinofílica crônica/síndrome hipereosinofílica, as DMPCs inclassificáveis³ e, mais recentemente, a mastocitose sistêmica.¹ Ademais, recentemente o termo “doenças mieloproliferativas crônicas” foi substituído por “neoplasias mieloproliferativas”.¹ Neste estudo serão abordadas as neoplasias mieloproliferativas (NMPs) clássicas, com ênfase na PV, TE e MP, daqui em diante chamadas de “NMPs”.

As NMPs constituem um grupo heterogêneo de doenças clonais que se originam da transformação de um precursor hematopoiético multipotente e caracterizam-se pela proliferação excessiva na medula óssea de uma ou mais linhagens hematopoiéticas, o que resulta em contagens elevadas de granulócitos, hemácias e/ou plaquetas no sangue periférico, à exceção da MP em sua fase fibrótica.²

Dentre os achados clínicos gerais podem ser observados sintomas constitucionais, esplenomegalia e, menos frequentemente, manifestações peculiares a alguns subtipos de NMP, como prurido aquagênico e eritromelalgia.^{21,22}

Estudos epidemiológicos realizados em alguns países mostraram uma incidência anual de PV e TE de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes; sendo a MP menos freqüente, cerca de 1 por 100.000.²³⁻²⁶ No Brasil, não há dados oficiais sobre a incidência das NMPs.

As NMPs têm como manifestações mais proeminentes um aumento da massa eritrocitária no caso da PV; um aumento da contagem de plaquetas na TE; e fibrose medular exuberante na MP.² Entretanto, essas entidades exibem uma notável superposição de características clínicas e biológicas que incluem: hiper celularidade medular e displasia megacariocítica; hematopoiese extramedular; formação de colônias eritróides e mielóides endógenas *in vitro*;²⁷ anormalidades citogenéticas envolvendo predominantemente os cromossomos 1, 8, 9, 13 e 20, presentes em cerca de 15% dos pacientes, dentre as quais a deleção do cromossomo 20q é a mais freqüente;^{28,29} propensão a eventos trombóticos e hemorrágicos;³⁰ além de risco de transformação fibrótica ou leucêmica em longo prazo.³¹ Ademais, as NMPs podem mimetizar situações reacionais ou secundárias, o que pode dificultar sobremaneira o diagnóstico preciso.

Até recentemente, a limitada compreensão sobre a patogênese molecular da PV, TE e MP, que se refletia na ausência de testes diagnósticos definitivos, bem como a escassez de ensaios clínicos randomizados, tornavam o manejo dessas entidades particularmente desafiador.³²

Várias evidências apontavam para o envolvimento de uma tirosina cinase (TC) na patogênese dessas doenças:

- A origem da LMC, reconhecidamente atribuída a uma TC desregulada, produto do gene de fusão *BCR-ABL*,⁴ que por sua vez é resultado da *t(9;22)(q34;q11)*, o cromossomo *Philadelphia*;

- A hipersensibilidade a citocinas exibida pelas células progenitoras mielóides de pacientes com PV,^{33,34} propriedade também observada em uma proporção de pacientes com TE e MP,³⁵⁻³⁷ o que sugere o acometimento primário de um dos componentes de sinalização, que normalmente funcionam em consonância com fatores de crescimento e seus receptores na regulação da hematopoiese.³⁸

- O envolvimento de outras TCs alteradas em pacientes com outras doenças mielóides neoplásicas: *FLT3* nas LMAs; *PDGFR β* na leucemia mielomonocítica crônica; *PDGFR α* (incluindo *FIP1L1-PDGFR α*), *PDGFR β* e *FGFR1* nas neoplasias mielóides associadas com eosinofilia; *KITD816V* e outras mutações do *KIT* na mastocitose sistêmica.³⁹⁻⁴²

Diante destas evidências, vários estudos foram realizados nos últimos anos, na tentativa de elucidar os mecanismos patogênicos das NMPs. Esses estudos foram facilitados pelos avanços tecnológicos na área da biologia molecular, incluindo o uso de microRNA e seqüenciamento.

Em 2005, uma importante lacuna no conhecimento sobre a patogênese das NMPs foi preenchida: vários grupos identificaram uma mutação adquirida na TC JAK2 em um número significativo de pacientes com doenças clonais mielóides, em especial PV, TE e MP.⁵⁻⁸

II.2. O gene JAK2

O gene *JAK2*, localizado no cromossomo 9p, codifica a proteína JAK2, uma TC citoplasmática que faz parte da família de cinases Janus (*Janus kinases* – JAKs), à qual também pertencem as proteínas JAK1, JAK3 e TYK2 (*tyrosine kinase 2*).⁴³ Tal denominação deve-se à disposição em tandem de dois domínios cinase simétricos, característica particular dessas proteínas: o domínio catalítico JH1 (*JAK homology 1*) e o domínio JH2, enzimaticamente inerte, mas aparentemente responsável pela regulação da atividade do JH1,⁴⁴ à semelhança da figura da mitologia romana de duas cabeças que olham em direções opostas, o deus Janus.

As JAKs possuem sete domínios homólogos (JH1-JH7), numerados do carboxi-terminal em direção ao amino-terminal e organizados em quatro regiões: JH1 (domínio cinase); JH2 (domínio pseudocinase); FERM (*four point one, ezrin, radixin, moesin*), composta pelos domínios JH5, JH6, JH7 e metade do JH4; e SH2-*like* (*SRC homology 2-like*), formada pela outra metade do JH4 e pelo JH3, conforme representado na Figura 1.⁴⁵ A porção FERM é responsável pela ligação das JAKs aos receptores de membrana, e parece estar relacionada com a regulação da expressão de alguns receptores^{46,47} e com a regulação do domínio JH1.⁴⁸ A porção SH2 tem função desconhecida.⁴³ Nos mamíferos, as proteínas JAK1, JAK2 e TYK2 estão presentes na maior parte das células, enquanto a expressão da JAK3 é praticamente restrita ao compartimento hematopoiético.⁴⁹

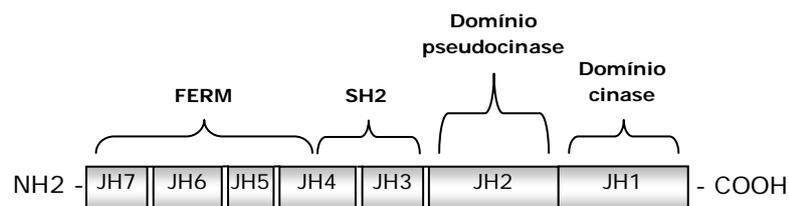


Figura 1: Representação esquemática da estrutura das JAKs

As JAKs são compostas por 4 regiões: FERM (domínios JH7, JH6, JH5 e parte do JH4), SH2-*like* (domínio JH3 e a outra parte do JH4), pseudocinase (JH2) e cinase (JH1).

JH: domínio homólogo JAK.

FERM: *four point one, ezrin, radixin, moesin*

SH2: *SRC homology 2-like*

As proteínas JAK estão ligadas à porção citoplasmática de receptores pertencentes à superfamília de receptores de citocinas, que não possuem domínios cinase intracelulares próprios.⁵⁰ Esses receptores JAK-dependentes respondem a citocinas e hormônios específicos, incluindo interleucinas, interferons, fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócito-monócito (GM-CSF), eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO), hormônio do crescimento (GH), prolactina, entre outros.^{43,49} Dessa forma, as JAKs

desempenham papel fundamental na sinalização mediada por citocinas e na transdução de sinais na maior parte das células dos mamíferos.

A ligação de uma citocina ao seu receptor específico resulta numa mudança de conformação do receptor, promovendo a fosforilação e a ativação da JAK, que por sua vez fosforila resíduos de tirosina da porção citoplasmática do receptor.⁵¹ Os resíduos fosforilados servem como sítio de ligação para moléculas da família dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (*signal transducers and activators of transcription* – STATs), além de outras moléculas de sinalização. Subseqüentemente, os STATs ativados entram no núcleo, onde atuarão como fatores de transcrição (Figura 2).^{52,53}

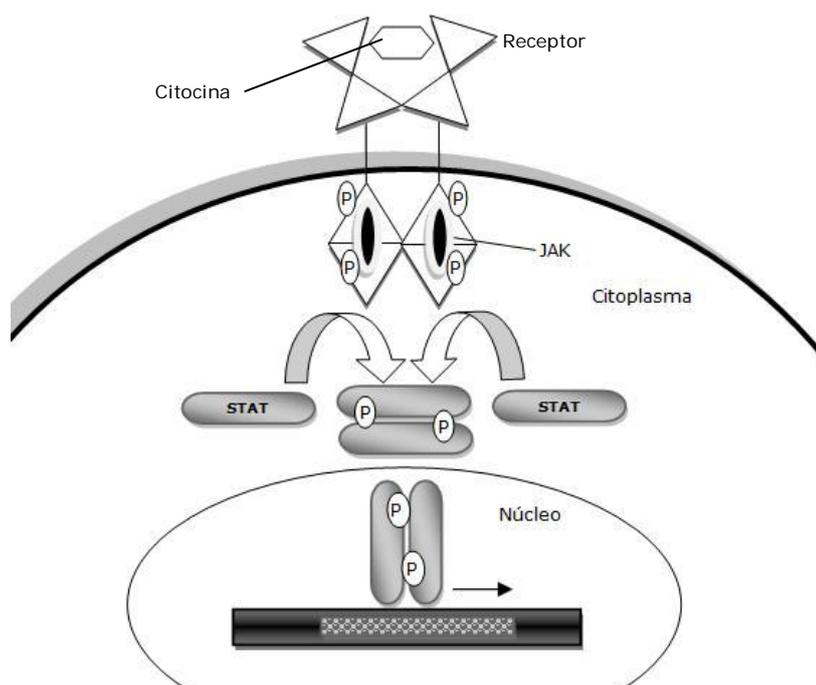


Figura 2: Representação esquemática da via JAK-STAT

A ligação de uma citocina ao seu receptor específico resulta em mudança de conformação do receptor, com fosforilação e ativação da JAK que, por sua vez, fosforila resíduos de tirosina da porção citoplasmática do receptor, que servirão como sítio de ligação para os STATs. Os STATs fosforilados formam dímeros que entrarão no núcleo e atuarão como fatores de transcrição.

Embora os diferentes efeitos fisiológicos disparados pela ligação de uma citocina ao seu receptor dependam da capacidade do mesmo de se associar a uma JAK específica, a maior parte dos receptores podem se associar a mais de uma JAK. Estudos bioquímicos e genéticos observaram que a JAK2 é essencial para a ação da EPO, da TPO, do GH e da prolactina, de citocinas que atuam através do receptor da interleucina 3 (IL-3): IL-3, IL-5 e GM-CSF e do interferon gamma (IFN γ). Além disso, está envolvida na sinalização mediada por citocinas que atuam através do receptor gp130, como IL-6, IL-11, IL12 e G-CSF.^{51,54-56} Esses achados sugerem que a JAK2 é a proteína JAK predominantemente envolvida na proliferação e diferenciação das células mielóides.

II.3. Alterações genéticas nas NMPs

As mutações ativadoras de TC que interferem em vias de proliferação e sobrevivência celular são cada vez mais reconhecidas como importantes causas de câncer.³²

II.3.1. A mutação V617F-JAK2

Conforme citado anteriormente, em 2005, quatro grupos de pesquisadores, usando diferentes abordagens, identificaram a primeira anormalidade molecular recorrente em pacientes com NMPs.⁵⁻⁸ Essa anormalidade consiste em uma mutação somática G \rightarrow T na posição 1849 do exon 14 do gene *JAK2*, que resulta na substituição de uma valina por uma fenilalanina no códon 617 (V617F).⁵⁷

A V617F-JAK2 ocorre no domínio auto-inibitório JH2 e acarreta a ativação constitutiva do domínio cinase adjacente (JH1), o que leva à ativação de várias vias de sinalização como a JAK-STAT, PI3K (**p**hosphatidy**l**inositol **3** kinase) e RAS-MAPK (**m**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase) e culmina com um fenótipo hiperproliferativo.⁵⁸

A Figura 3 mostra o papel da JAK2 nas vias de sinalização e o efeito da mutação V617F-JAK2, usando como exemplo o receptor de eritropoietina (EPOR).

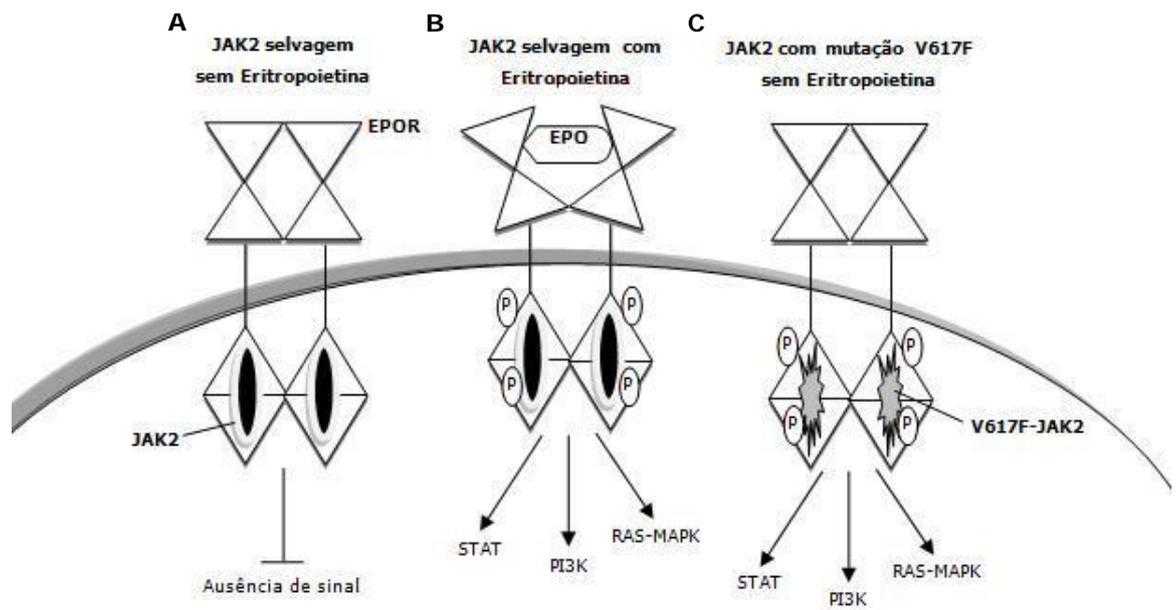


Figura 3: Papel da JAK2 nas vias de sinalização relacionadas ao receptor de eritropoietina e efeito da mutação V617F-JAK2

- Na ausência da eritropoietina (EPO), o receptor de eritropoietina (EPOR) está ligado à JAK2 como um dímero inativo.
- Nas células com a JAK2 selvagem, a ligação da EPO ao seu receptor induz alterações conformacionais, resultando em fosforilação (*phosphorylation* – P) da JAK2 e da porção citoplasmática do receptor, o que ativa vias de sinalização como a JAK-STAT, PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) e RAS-MAPK (mitogen-activated protein kinase).
- Nas células com a mutação V617F-JAK2, a sinalização é constitutiva, independente da presença da EPO.

Desde a descrição da V617F-JAK2, inúmeros estudos científicos foram publicados, não só sobre a sua prevalência e correlações clínicas em vários contextos, bem como sobre o gene *JAK2* e outros genes, na tentativa de se elucidar outros mecanismos patogênicos das NMPs.

Inicialmente identificada em pacientes com PV (65-97%), TE (23-57%) e MP (35-57%),⁵⁻⁸ a V617F-JAK2 foi subseqüentemente encontrada, em menor freqüência, em pacientes com outras doenças neoplásicas mielóides, incluindo síndromes mielodisplásicas (SMDs) e LMAs (<5%).⁵⁹⁻⁶¹ Um subtipo de anemia refratária com sideroblastos em anel associada a trombocitose foi recentemente identificada como uma doença mielóide associada à V617F-JAK2, com freqüência observada de 48 a 90%.^{60,62,63}

A V617F-JAK2 não foi observada em pacientes com doenças neoplásicas linfóides,^{64,65} tumores sólidos,^{61,66} ou pacientes com mieloproliferação secundária.^{6,67,68} Relatos isolados de concomitância entre a V617F-JAK2 e o gene de fusão BCR-ABL foram publicados.^{69,70} Além disso, a mutação V617F-JAK2 foi detectada em uma pequena proporção de pacientes chineses sem doenças hematológicas,⁷¹ bem como em 10% de doadores saudáveis, em níveis muito baixos, usando metodologia altamente sensível.^{72,73}

A discrepância significativa observada em relação à prevalência da V617F-JAK2 nos vários subtipos de NMPs pode ser explicada pelos diferentes métodos de detecção usados, diferentes subpopulações celulares estudadas, bem como pelos critérios diagnósticos utilizados.^{9,74} Ademais, por serem estudos retrospectivos, o efeito do tratamento pode ser considerado como causa de não-deteção da mutação em alguns pacientes, conforme recentemente demonstrado.⁷⁵⁻⁷⁷

II.3.2. Métodos para a detecção da V617F-JAK2

Vários testes, qualitativos e quantitativos, vêm sendo desenvolvidos e validados para a detecção e a quantificação alélica da V617F-JAK2.^{78,79} A interpretação dos resultados de cada estudo deve considerar a sensibilidade analítica da metodologia empregada.

No estudo de Baxter e cols.,⁵ por exemplo, a freqüência da mutação em pacientes com PV aumentou de 73% para 97%, com o uso de seqüenciamento

(sensibilidade em torno de 20%) e de reação em cadeia da polimerase alelo-específica (*allele-specific polymerase chain reaction*, AS-PCR) (sensibilidade em torno de 3%), respectivamente. Por outro lado, resultados falso positivos podem ocorrer com o uso de metodologias muito sensíveis (cerca de 0,01%), que podem detectar níveis muito baixos da V617F-JAK2 até em indivíduos saudáveis.⁷³

A. Seqüenciamento direto

Embora o método de seqüenciamento direto forneça informação detalhada e seja considerado um método de “visualização direta” da sequência, característica particularmente útil nos casos de grande heterogeneidade alélica, tem como limitações a baixa sensibilidade (cerca de 20%),⁸⁰ alto custo, tempo longo de execução e a disponibilidade limitada a poucos laboratórios. Por esses motivos, não é o método mais adequado ao uso na rotina no laboratório clínico para a detecção da V617F-JAK2.

B. Pirosequenciamento

O método de pirosequenciamento baseia-se na detecção de sinal luminoso proveniente de uma reação luciferase, a partir de pirofosfatos usados como fonte de adenosina trifosfato (ATP), liberados pela incorporação dos nucleotídeos durante a síntese de DNA.⁸¹

É um método de genotipagem rápido, semiquantitativo, com sensibilidade analítica estimada em 5%.⁸² Não é usado na rotina de laboratórios clínicos usualmente devido ao alto custo e necessidade de pessoal treinado para sua realização.

C. AS-PCR

Há vários métodos que utilizam iniciadores alelo-específicos, em plataformas de PCR qualitativas e quantitativas, com várias denominações, como por exemplo: ARMS-PCR – PCR baseada no sistema de mutação refratário à amplificação (*amplification refractory mutation system* – ARMS), SSP-PCR – PCR baseada na utilização de iniciadores específicos para a sequência do alelo polimórfico

(*sequence-specific primer* – SSP). São testes altamente sensíveis (0,01 a 2%), rápidos e acessíveis à maior parte dos laboratórios de diagnóstico molecular. A maior limitação é a impossibilidade de detecção de outras alterações do gene *JAK2*.

Embora a relevância clínica da utilização de metodologia muito sensível ainda não esteja esclarecida,⁸¹ a detecção de carga alélica mutada muito baixa poderá ser útil na vigência de tratamento com inibidores específicos para a V617F-*JAK2*, atualmente em investigação em vários estudos clínicos.⁸³⁻⁸⁵

Alguns detalhes dos métodos de AS-PCR serão abordados mais adiante, na seção de Métodos.

D. PCR-RFLP

A PCR do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) é um método que se utiliza da atividade das enzimas de restrição para digerir os produtos amplificados numa PCR.

A mutação V617F-*JAK2* abole um sítio de clivagem reconhecido pela enzima *BsaXI*.⁵ Embora não seja a situação ideal, já que uma reação de clivagem negativa pode corresponder a um falso positivo devido a falha no processo de digestão, a PCR-RFLP é um método simples, de baixo custo e que pode ser usado para uma triagem inicial.⁸¹ Os resultados alterados devem, no entanto, ser confirmados por outra metodologia.

E. PCR em tempo real

Nas reações de PCR em tempo real, moléculas fluorescentes (corantes que se ligam inespecificamente ao DNA ou sondas específicas marcadas) são incorporadas ao DNA durante a fase exponencial da reação e monitoradas à medida que se acumulam. A emissão de luz é proporcional à quantidade de produto gerado que, por sua vez, é proporcional à quantidade de sequências-alvo no início da reação.

O método tem como vantagens rapidez, simplicidade, possibilidade de quantificação alélica e custo relativamente baixo, se o laboratório conta com o

equipamento de PCR em tempo real. A sensibilidade analítica descrita é de 1 a 10% de DNA mutado.⁷⁹ A principal desvantagem é a incapacidade de detecção de outras alterações do gene *JAK2*.

II.3.3. Impacto da V617F-JAK2 no fenótipo e no prognóstico das NMPs

Várias evidências apontam para diferenças fenotípicas significativas entre pacientes com NMP com e sem a mutação V617F-JAK2. Nos pacientes com TE, a presença/ausência da mutação define dois subtipos distintos de pacientes: aqueles com a V617F-JAK2 caracterizam-se por níveis mais altos de hemoglobina e mais baixos de EPO e ferritina, maior contagem de leucócitos, menor contagem de plaquetas, maior risco de evolução para PV e maior risco de trombose venosa.^{12,13,86} Embora os dados sobre o risco aumentado de trombozes sejam divergentes,^{87,88} uma meta-análise publicada recentemente mostrou uma correlação entre a presença da V617F-JAK2 e maior risco de trombose arterial [OR = 1,68 (95% CI, 1,31–2,15), $p < 0,0001$] e venosa [OR = 2,5 (95% CI, 1,71–3,66), $p < 0,0001$].⁸⁹ No entanto, algumas limitações como a impossibilidade de análise direta da interação entre o status mutacional e outros fatores de risco bem estabelecidos mostram a necessidade de validação prospectiva desses achados.

Nos pacientes com MP, a importância prognóstica da V617F-JAK2 é controversa. Há evidências que sugerem uma menor sobrevida em pacientes com MP V617F-JAK2-positivos,^{90,91} enquanto outros estudos não observaram impacto significativo.^{92,93}

II.3.4. O papel da carga alélica da V617F-JAK2

O papel da carga de alelo com a mutação V617F-JAK2 também tem sido alvo de intensa investigação. Estudos experimentais com camundongos transgênicos expressando diferentes níveis de V617F-JAK2 demonstraram que uma

carga baixa da mutação induz um fenótipo TE-símile, enquanto níveis mais altos de alelo mutado levam a um fenótipo PV-símile.⁹⁴

Vários estudos mostraram que a dosagem gênica da V617F-JAK2 tem influência no fenótipo das NMPs. De modo geral, a mutação em homozigose foi observada em 30 a 70% dos pacientes com PV, em cerca de 30% dos pacientes com MP, porém raramente naqueles com TE.^{5-8,95} No estudo de Antonioli e cols., os pacientes com TE e MP (pós-PV ou pós-TE) apresentaram os menores e maiores valores de carga alélica mutada, respectivamente, enquanto valores intermediários foram observados nos pacientes com PV e MP.⁹⁶

Tefferi e cols. observaram um maior nível de hemoglobina ao diagnóstico, maior incidência de prurido e maior taxa de transformação fibrótica em pacientes com PV homozigotos para a V617F-JAK2.⁹⁷ Esses achados foram confirmados e expandidos por Vannucchi e cols., que observaram que pacientes com PV e carga de V617F-JAK2 maior que 75% ao diagnóstico apresentaram doença de alto risco, com maior necessidade de quimioterapia e maior frequência de eventos cardiovasculares, quando comparados com pacientes com menos de 25% de alelo mutado.⁹⁸ Em outro estudo envolvendo 323 pacientes com PV e 639 com TE, o mesmo grupo observou ainda que pacientes homozigotos tinham idade mais avançada, valores mais altos de hematócrito e contagem de leucócitos, esplenomegalia mais acentuada ao diagnóstico, maior risco de transformação fibrótica e maior risco de eventos cardiovasculares.⁹⁹

No que se refere aos pacientes com MP, um estudo de Barosi e cols. envolvendo mais de 300 pacientes mostrou associação independente entre a presença da V617F-JAK2 em homozigose e leucocitose, esplenomegalia mais acentuada e maior necessidade de quimioterapia para controle da doença.⁹¹ Cabe ressaltar que a conversão do status heterozigoto para o homozigoto foi observada em alguns casos, eventualmente coincidindo com a progressão da doença. Entretanto, esse é um tema que permanece em aberto.¹⁰⁰

Em suma, esses achados sugerem que a homozigose para a mutação V617F-JAK2 está associada a uma doença mais sintomática, além de ressaltarem a relevância clínica da determinação da carga alélica.

II.3.5. Impacto da V617F-JAK2 na classificação e abordagem das NMPs

O objetivo de qualquer sistema de classificação é identificar entidades biológicas distintas pela etiologia, mecanismos patogênicos, características clínico-patológicas e prognósticas, visando traçar estratégias terapêuticas mais adequadas a cada uma delas.

Ao longo do tempo, os critérios para a classificação das NMPs passaram por várias modificações, acompanhando a aquisição de novos conhecimentos. O Grupo de Estudo em PV (PVSG) propôs o primeiro sistema de classificação em 1975,^{101, 102} que posteriormente foi revisto por Pearson em 1996,¹⁰³ incorporando alguns aspectos como a formação de colônias eritróides endógenas (CEE) e a dosagem de EPO.

Em 2001, a OMS sugeriu novos critérios, com a inclusão do genótipo que, naquele momento, restringia-se à identificação do cromossomo *Philadelphia* ou do seu equivalente molecular, o transcrito de fusão BCR-ABL (Tabelas 1 e 2).³

Tabela 1: Classificação proposta pela OMS em 2001 para as doenças mieloproliferativas crônicas³

Leucemia mielóide crônica (Cromossomo Philadelphia – t(9;22)(q34;q11) ou BCR-ABL-positiva)
Leucemia neutrofílica crônica
Leucemia eosinofílica crônica/Síndrome hipereosinofílica
Policitemia vera
Trombocitemia essencial
Mielofibrose primária
Doença mieloproliferativa crônica inclassificável

OMS, Organização Mundial de Saúde.

Tabela 2: Critérios propostos em 2001 pela OMS para o diagnóstico da policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária³

Critérios	Policitemia vera	Trombocitemia essencial	Mielofibrose primária
Maiores	1. ↑ massa eritrocitária ou Hb > 18,5 g/dL (homens) Hb > 16,5 g/dL (mulheres) 2. Ausência de evidência de eritrocitose secundária 3. Esplenomegalia 4. Alteração clonal (não-BCR-ABL) 5. Formação de CEE <i>in vitro</i>	1. Trombocitose mantida: $\geq 600 \times 10^9/L$ 2. Alterações histológicas 3. Ausência de evidência de estado reativo 4. Não preencher critério para PV, MP, LMC ou SMD - Alterações histológicas: - Proliferação de megacariócitos grandes e maduros - Pouca ou nenhuma proliferação granulocítica ou eritrocítica	CRITÉRIOS FASE PRÉ-FIBRÓTICA - Alterações histológicas discretas - Leucoeritroblastose/dacriocitose - Anemia e/ou organomegalia leve - Leucotrombocitose leve CRITÉRIOS FASE PRÉ-FIBRÓTICA - Alterações histológicas avançadas - Leucoeritroblastose/dacriocitose significativas - Anemia e/ou organomegalia acentuada - Leucotrombocitose acentuada
Menores	1. Trombocitose $\geq 400 \times 10^9/L$ 2. Leucocitose $\geq 12 \times 10^9/L$ 3. Alterações histológicas (panmielose) 4. ↓ EPO	Não há	Não há
Diagnóstico	Preencher os 2 primeiros critérios maiores e mais 1 maior ou mais 2 menores	Preencher todos os critérios	NA

CEE, colônias eritróides endógenas; EPO, eritropoietina; LDH, desidrogenase láctica; LMC, leucemia mielóide crônica; MO, medula óssea; MP, mielofibrose primária; NA, não se aplica; OMS, Organização Mundial de Saúde; PV, policitemia vera; SMD, síndrome mielodisplásica; TE, trombocitemia essencial.

Os avanços recentes na compreensão da patogênese molecular redefiniram e reforçaram o papel da histopatologia da MO,¹⁰⁴ bem como permitiram a proposição de novos sistemas classificatórios, conduzindo para uma mudança no diagnóstico tradicional dessas entidades, de um modelo clínico-patológico para uma categorização semi-molecular.⁵⁷

Em 2008, a OMS propôs uma revisão dos critérios de 2001, incluindo as mutações do gene *JAK2* e do *MPL* como critérios maiores para o diagnóstico das NMPs BCR-ABL-negativas (Tabelas 3 e 4).^{1,105} Além disso, o termo doença mieloproliferativa crônica foi substituído por neoplasia mieloproliferativa, conforme citado anteriormente.

Tabela 3: Classificação proposta pela OMS em 2008 para as doenças neoplásicas mielóides¹

1.	Leucemia mielóide aguda
2.	Síndromes mielodisplásicas (SMDs)
3.	Neoplasias mieloproliferativas (NMPs)
3.1	Leucemia mielóide crônica
3.2	Policitemia vera
3.3	Trombocitemia essencial
3.4	Mielofibrose primária
3.5	Leucemia neutrofilica crônica
3.6	Leucemia eosinofílica crônica, não categorizada
3.7	Síndrome hipereosinofílica
3.8	Mastocitose sistêmica
3.9	NMPs, inclassificáveis
4.	SMD/NMP
4.1	Leucemia mielomonocítica crônica
4.2	Leucemia mielomonocítica juvenil
4.3	Leucemia mielóide crônica atípica
4.4	SMD/NMP, inclassificável
5.	Neoplasias mielóides associadas com eosinofilia e alterações do <i>PDGFRα</i> , <i>PDGFRβ</i> ou <i>FGFR1</i>
5.1	Neoplasias mielóides associadas com alterações do <i>PDGFRα</i>
5.2	Neoplasias mielóides associadas com alterações do <i>PDGFRβ</i>
5.3	Neoplasias mielóides associadas com alterações do <i>FGFR1</i> (síndrome mieloproliferativa 8p11)

FGFR, fibroblast growth factor receptor; OMS, Organização Mundial de Saúde; *PDGFR*, platelet-derived growth factor receptor.

De acordo com os critérios propostos, a evidência de eritrocitose associada à presença de V617F-JAK2 ou outra mutação do gene *JAK2* é altamente sugestiva do diagnóstico de PV. Já a ausência de uma das mutações em pacientes com eritrocitose, associada a níveis elevados de EPO, sugere fortemente policitemia secundária.^{57,105}

Nos casos de suspeita de TE e MF, a utilidade da V617F-JAK2 é restrita, devido ao baixo valor preditivo negativo e à inespecificidade diagnóstica do teste nas doenças neoplásicas mielóides.⁶⁷ Por isso, apesar da presença da mutação ser altamente sugestiva do diagnóstico, são necessários outros parâmetros clínico-laboratoriais, a BMO e a exclusão de outros subtipos de NMP.¹⁰⁵

Na suspeita de TE, a BMO tem papel fundamental na diferenciação entre as TE V617F-JAK2-negativas e as situações reativas, além do diagnóstico diferencial

com outras trombocitoses clonais, como por exemplo, a fase pré-fibrótica da MP e as SMDs.⁵⁸

Similarmente, na suspeita de MP a BMO é indispensável para confirmar a presença das características histológicas peculiares, bem como para o diagnóstico diferencial com outras doenças neoplásicas mielóides, a exemplo da SMD com fibrose. Ainda nesse contexto, a presença da V617F-JAK2 é bastante útil para afastar a possibilidade de mielofibrose reativa a processos inflamatórios, toxinas, neoplasias linfóides ou metástases.¹⁰⁵

Tabela 4: Critérios propostos pela OMS em 2008 para o diagnóstico da policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária¹

Critérios	Policitemia vera	Trombocitemia essencial	Mielofibrose primária
Maiores	1. Hb > 18,5 g/dL (homens), Hb > 16,5 g/dL (mulheres) ou outra evidência de ↑ massa eritrocitária 2. Presença de V617F-JAK2 ou mutação funcionalmente similar como as mutações do exon 12 do gene JAK2	1. Trombocitose mantida: $\geq 450 \times 10^9/L$ 2. Alterações histológicas 3. Não preencher critério para PV, MP, LMC ou SMD 4. Presença de marcador clonal (V617F-JAK2 ou outro) ou ausência de evidências de estado reativo . Alterações histológicas: - Proliferação de megacariócitos grandes e maduros - Pouca ou nenhuma proliferação granulocítica ou eritrocítica	1. Alterações histológicas 2. Não preencher critério para PV, LMC, SMD ou outro NMP 3. Presença de marcador clonal (V617F-JAK2 ou outro) ou ausência de evidências de fibrose devido a estado reativo [#] . Alterações histológicas: - Proliferação de megacariócitos com atipias* + fibrose reticulínica e/ou colágena. ou - Na ausência de fibrose reticulínica, ↑ celularidade medular, proliferação granulocítica e ↓ eritropoiese (fase pré-fibrótica)
Menores	1. Alterações histológicas (panmielose) 2. ↓ EPO 3. Formação de CEE <i>in vitro</i>	Não há	1. Leucoeritroblastose** 2. ↑ LDH** 3. Anemia** 4. Esplenomegalia**
Diagnóstico	Preencher o primeiro critério maior e 2 menores <u>ou</u> os 2 maiores e 1 menor	Preencher todos os critérios	Preencher os 3 critérios maiores e 2 menores

[#]Fibrose secundária a doenças inflamatórias (infecções, doenças auto-imunes, outras doenças inflamatórias crônicas) ou neoplásicas (leucemia de células pilosas, outras neoplasias linfóides, metástases) ou mielopatias tóxicas crônicas. * Agrupamentos de megacariócitos de tamanhos variados, com relação núcleo-citoplasma aberrante e núcleos hipercrômicos ou irregularmente dobrados. ** Qualquer grau de anormalidade. CEE, colônias eritróides endógenas; EPO, eritropoietina; LDH, desidrogenase láctica; LMC, leucemia mielóide crônica; MO, medula óssea; MP, mielofibrose primária OMS, Organização Mundial de Saúde; PV, policitemia vera; SMD, síndrome mielodisplásica; TE, trombocitemia essencial.

II.3.6. Outras mutações do gene *JAK2* e mutações do gene *MPL*

Como a tirosina cinase ativada V617F-JAK2 explica muitas das alterações observadas nas NMPs, num primeiro momento “tudo parecia fazer sentido” (“It all makes sense”, Kaushansky 2005).¹⁰⁶ Entretanto, logo surgiram diversas questões intrigantes, a maioria ainda sem resposta, como a necessidade de compreender como uma única mutação pode gerar três doenças distintas, e quais os mecanismos de doença nos pacientes V617F-JAK2-negativos.¹⁰⁷

Na tentativa de identificar outros genes envolvidos na patogênese molecular das NMPs e com base na hipótese de que a via JAK-STAT teria papel central também na patogênese das NMPs V617F-JAK2-negativas, vários estudos vêm sendo realizados.

Em 2007, mutações do exon 12 do gene *JAK2* foram descritas em pacientes com PV V617F-JAK2-negativos, nos quais a manifestação predominante era eritrocitose.¹⁰⁸ As mutações do exon 12 do gene *JAK2* induzem proliferação independente de citocinas em linhagens celulares que expressam o EPOR, com conseqüente ativação da via de sinalização JAK-STAT, à semelhança da V617F-JAK2. Até o momento, pelo menos oito diferentes mutações foram identificadas no exon 12 do gene *JAK2*.^{109,110}

Outras mutações de ganho de função relacionadas às NMPs envolvendo a ativação da via JAK-STAT foram descritas recentemente. Tais mutações ocorrem no receptor da trombopoietina (*MPL*) e envolvem a substituição de um triptofano (W) por uma leucina (L) ou por uma lisina (K) no códon 515 (W515L ou W515K).^{111,112} Essas mutações foram observadas em 5% e 1% dos pacientes com MP ou TE, respectivamente, mas não em pacientes com PV ou outras doenças mielóides.¹¹² Mais recentemente, outras mutações do *MPL* foram descritas: W515A, S204P¹⁰⁹ e S505N.¹¹³

A descoberta das mutações na JAK2 e no receptor MPL significou um grande avanço no diagnóstico e na caracterização das NMPs, além da abertura de novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos e para o desenvolvimento de terapias dirigidas. Porém, um modelo simples para explicar a fisiopatologia das NMPs, incorporando somente essas mutações, logo se mostrou inadequado.¹¹⁴ Até o momento, o que está bem estabelecido é que a diversidade fenotípica exibida pelas NMPs pode ser atribuída a diferentes configurações de transdução de sinal alterada, que resultam de um espectro de mutações que afetam TCs ou moléculas relacionadas.¹¹⁵

II.4. Complicações trombóticas nas NMPs

Os eventos trombóticos representam uma das principais complicações das NMPs e são a principal causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com PV e TE.^{17,31,116} Esses eventos trombóticos incluem alterações na microcirculação, bem como trombozes arteriais e venosas, que podem se manifestar ao diagnóstico, durante o curso ou, curiosamente, até alguns anos antes do início da doença.^{10,18,117}

Os relatos sobre a incidência de episódios trombóticos no momento do diagnóstico das NMPs variam consideravelmente na literatura, de 9,7 a 29,4% na TE e 12 a 39% na PV.^{19,118} Tais variações podem ser explicadas, entre outras causas, pela natureza retrospectiva da maior parte dos estudos realizados, pelo número pequeno de pacientes analisados e pela heterogeneidade de critérios para a definição dos eventos trombóticos.

De modo geral, tanto na PV como na TE, as manifestações trombóticas arteriais são mais comuns que as venosas.³⁰ Somente no Estudo Colaborativo Europeu para Avaliação de Baixa dose de Aspirina na PV (*European Collaboration on low-dose aspirin in polycythemia vera – ECLAP*), estudo de coorte prospectivo

envolvendo 1638 pacientes com PV, observou-se frequência similar de trombozes arteriais e venosas.¹⁰

As alterações na microcirculação estão relacionadas com trombocitose, são mais comuns na TE e as principais manifestações clínicas incluem sintomas visuais e auditivos, cefaléia e eritromelalgia.¹⁸

Em relação às trombozes arteriais, os vasos cerebrais e coronarianos são os mais comumente acometidos.¹⁸

II.4.1. Acidente vascular encefálico isquêmico nas NMPs

O acidente vascular encefálico (AVE) é definido como uma síndrome clínica caracterizada por uma deficiência neurológica focal de início súbito, provocada por lesão de origem vascular, com duração maior que 24 horas.¹¹⁹ Cerca de 80% dos casos são eventos isquêmicos cerebrais, decorrentes da oclusão de um vaso e 20% são eventos hemorrágicos resultantes de ruptura arterial.¹²⁰

O acidente vascular encefálico isquêmico, conforme os critérios do Ensaio Clínico Org 10172 no Tratamento do Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Agudo ("Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment - TOAST"),¹²¹ é classificado em cinco subtipos: 1- aterosclerótico de grandes vasos; 2- cardioembólico; 3- lacunar (oclusão de pequenas artérias); 4- de etiologias específicas; e 5- de etiologia indefinida. Este sistema de classificação baseia-se nos sinais e sintomas clínicos; nos resultados dos exames de imagem do encéfalo (tomografia computadorizada ou ressonância magnética); do coração (ecocardiograma) e das artérias extracranianas (ecodoppler de carótidas, angio-tomografia cervical, angio-ressonância cervical e arteriografia) e intracranianas (arteriografia); e na exclusão de estados pró-trombóticos.

Resumidamente, são classificados como "ateroscleróticos de grandes vasos" os AVEs com estenose ou oclusão da luz maior que 50%, como os que acometem a

carótida interna ou ramos arteriais intracranianos, com lesões isquêmicas com mais de 1,5 cm, localizadas na região cortical, subcortical, cerebelo ou tronco cerebral.¹²¹

Os AVEis “cardioembólicos” são aqueles em que a oclusão arterial ocorre devido a êmbolo originário do coração.¹²¹

No subtipo lacunar, os pacientes apresentam síndromes clínicas isoladas, sem evidência de disfunção cortical; e imagens do encéfalo são normais ou mostram infartos menores que 1,5 cm de diâmetro no cérebro ou tronco cerebral.¹²¹

Os AVEis “de etiologia específica” incluem causas raras e bem estabelecidas de isquemia, tais como vasculopatias não-ateroscleróticas (vasculites, dissecções arteriais, entre outras), estados de hipercoagulabilidade e doenças hematológicas, como a anemia falciforme e as NMPs.¹²¹

Por último, o AVEi é “de etiologia indefinida” se a causa do infarto não puder ser determinada apesar de uma investigação completa. São incluídos também nessa categoria os AVEis sem causa definida após uma investigação incompleta, bem como os casos em que coexistem duas ou mais causas, sem que se possa chegar a um diagnóstico etiológico único.¹²¹

Os AVEis correspondem a cerca de 30 a 40% das manifestações trombóticas em pacientes com PV, além de representarem a principal causa de morte em pacientes com PV não-tratados.^{17,18} As síndromes coronarianas agudas são menos freqüentes, mas há estudos que mostram a ocorrência de infarto agudo do miocárdio (IAM) em pacientes sem fatores de risco e sem alterações nas coronárias.^{122,123}

II.4.2. Trombose venosa nas NMPs

Em relação aos eventos trombóticos venosos, trombose venosa superficial e trombose venosa profunda (TVP) de membros inferiores são as manifestações mais comuns em pacientes com PV e TE, seguidas por tromboembolismo pulmonar

(TEP).^{18,118} Adicionalmente, trombozes em locais não-habituais como as veias esplâncnicas (esplênica, mesentéricas, porta e hepáticas), cerebrais, renais e subclávias são observadas nestes pacientes com maior frequência do que na população geral.¹⁸

II.4.2.1. Trombose venosa cerebral nas NMPs

A trombose venosa cerebral (TVC) é uma doença rara, com incidência anual estimada em 3 a 4 casos por milhão, representando menos que 0,5% de todos os acidentes vasculares encefálicos.^{124,125} As manifestações clínicas da TVC variam sobremaneira, sendo as mais comuns: cefaléia; convulsão; déficit neurológico focal; alteração do estado de consciência e papiledema. Esses achados têm gravidade variável e podem ocorrer isoladamente ou em conjunto com outros sinais e sintomas.¹²⁵

O diagnóstico da TVC baseia-se nos achados clínicos e em exames de imagem, que devem incluir métodos de imagem do encéfalo (tomografia computadorizada ou ressonância magnética) associados a métodos de imagem do sistema venoso cerebral propriamente dito. O padrão ouro é a combinação da ressonância magnética com a venografia por ressonância magnética.¹²⁵

Fatores de risco protrombóticos, causas diretas ou ambos podem ser identificados em cerca de 85% dos pacientes com TVC.^{124,126} As NMPs são consideradas fatores de risco, chegando a 1% de prevalência de TVC em um grupo de 187 pacientes com TE.¹¹

II.4.2.2. Trombose venosa esplâncnica nas NMPs

A trombose da veia porta (TP) e a trombose das veias hepáticas – a síndrome de Budd-Chiari (SBC) são condições raras e graves, frequentemente associadas a um ou mais fatores de risco hereditários ou adquiridos.¹²⁷

A principal manifestação da TP é hemorragia digestiva alta devido ao sangramento de varizes esofageanas. Outros achados incluem esplenomegalia, ascite, dor abdominal, inapetência, fadiga e perda de peso.¹²⁸

A ultra-sonografia com Doppler é altamente sensível e específica para o diagnóstico de TP e raramente é necessário usar outros métodos como angiografia por ressonância magnética ou tomografia computadorizada.¹²⁷

A SBC é considerada primária se relacionada com lesões venosas primárias como flebite, trombose ou fibrose. A SBC secundária caracteriza-se por invasão ou compressão por tumores hepáticos, leiomiiossarcomas venosos ou doença hepática equinocócica¹²⁹ e não será abordada nesse estudo.

O quadro clínico da SBC caracteriza-se por dor abdominal, ascite, hepatoesplenomegalia e hipertensão portal. Entretanto, há grande heterogeneidade no que se refere à apresentação e ao curso da doença, incluindo formas assintomáticas nas quais o fluxo hepático é mantido pela preservação de algumas veias hepáticas ou pela formação de colaterais.¹²⁹

A SBC pode ser diagnosticada com métodos de imagem não-invasivos como a ultra-sonografia com Doppler, tomografia computadorizada ou ressonância magnética.¹³⁰

Os pacientes com NMP apresentam uma frequência particularmente alta de trombose venosa esplâncnica (TVE), em especial TP e SBC, chegando a 5-13% em pacientes com PV e TE.^{11,131,132} Reciprocamente, NMPs clinicamente aparentes podem ser observadas em 15-50% dos pacientes com TVE.¹³³⁻¹³⁶ Mais comumente, as TVEs são uma complicação precoce no curso das NMPs e podem ocorrer antes do diagnóstico.¹⁹

No entanto, o diagnóstico das NMPs em pacientes com TVEs pode ser dificultado pela presença de sangramentos ocultos, hemodiluição e hiperesplenismo, que podem mascarar as contagens das células sanguíneas. Ademais, o achado de esplenomegalia, característico das NMPs, muitas vezes é

atribuído somente à trombose esplâncnica nesse contexto.¹³⁷ Esses casos de difícil diagnóstico são referidos como NMPs “latentes” ou “ocultas” e sua prevalência é estimada em 40 a 60% dos pacientes com TP ou SBC.^{127,137}

Algumas estratégias como a biópsia de medula óssea (BMO), o ensaio para a formação espontânea de colônias eritróides endógenas (CEE) e a dosagem de EPO foram utilizadas para aprimorar o diagnóstico nesses casos, mas mostraram-se inadequadas para essa finalidade.¹³⁸⁻¹⁴¹ Portanto, parâmetros mais objetivos, como marcadores moleculares, são claramente necessários.

II.4.3. Fatores de risco para trombooses nas NMPs

A idade avançada e a história prévia de episódios trombóticos são fatores de risco bem estabelecidos para trombose em pacientes com NMP.^{10,117,142} Recentemente, alguns estudos demonstraram que a leucocitose é também um fator de risco independente.^{143,144}

Vários estudos analisaram o papel de fatores de risco cardiovasculares bem estabelecidos (*diabetes mellitus*, hipertensão, tabagismo, dislipidemia) para trombose arterial em pacientes com NMP, com resultados conflitantes.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ No estudo observacional ECLAP, além da idade, eventos trombóticos prévios e leucocitose, o tabagismo foi identificado como fator de risco independente para trombose arterial em pacientes com PV.¹⁴³ Um resultado semelhante foi observado por Wolanskyj e cols. em uma coorte prospectiva de 322 pacientes com TE, que identificou idade avançada, leucocitose, tabagismo e *diabetes mellitus* como fatores preditores de pior sobrevida.¹⁴⁸

Os estudos que exploraram a contribuição de fatores pró-trombóticos hereditários e adquiridos para trombose em pacientes com NMP forneceram poucos dados significativos. Um estudo retrospectivo envolvendo pacientes com PV (n=178) e TE (n=126) mostrou diferença significativa na prevalência do Fator V Leiden em pacientes com e sem história de eventos trombóticos (16% vs. 3%).¹⁴⁹

Além disso, alguns estudos mostraram níveis elevados de homocisteína em pacientes com NMP,¹⁵⁰⁻¹⁵² mas o impacto clínico, traduzido pela associação com trombose arterial, foi somente observado em um deles.¹⁵²

II.5. Mutação V617F-JAK2 e trombose

No momento, o impacto prognóstico da presença da V617F-JAK2 ou de sua carga alélica nos pacientes com NMPs é ainda incerto.^{58,153} Entretanto, várias evidências clínicas sugerem uma associação da V617F-JAK2 com eventos trombóticos, conforme citado anteriormente. Essas observações geraram interesse imediato no estudo da prevalência da mutação V617F-JAK2 em pacientes com trombozes, em especial de territórios não-usuais como as veias cerebrais e esplâncnicas.

Na ausência de evidências clínico-laboratoriais de NMP, a V617F-JAK2 foi observada em 18-74% de pacientes com trombose venosa esplâncnica,^{141,154-157} e em 0-14% de pacientes com trombose venosa cerebral,^{154,158-162} levantando questões como o seu papel diagnóstico nesses contextos,^{161,163} bem como o valor de sua pesquisa em pacientes com trombose de outras localizações.^{153,166} Valores tão discrepantes para a frequência da mutação entre os estudos podem ser atribuídos à grande heterogeneidade no que se refere ao tipo de amostra utilizada, à metodologia empregada para a detecção da mutação e aos critérios de seleção usados. A Tabela 5 mostra as principais características e resultados dos estudos que analisaram a frequência da V617F-JAK2 em pacientes com TVE e TVC.

Os estudos realizados posteriormente para investigar a prevalência da V617F-JAK2 em pacientes com trombose arterial (AVEi, IAM ou trombose arterial periférica) ou trombose venosa de outras localizações, observaram ausência ou baixa prevalência da mutação (Tabela 6).^{157,159,162,164-170}

Embora a patogênese do estado de hipercoagulação associado às NMPs ainda não esteja elucidada, anormalidades relacionadas a plaquetas e leucócitos parecem ser particularmente importantes.¹⁵³ Há evidências recentes que sugerem

que o fenótipo V617F-JAK2-positivo exibe maior grau de ativação plaquetária e leucocitária quando comparado ao V617F-JAK2-negativo.¹⁷¹ Entretanto, o papel da V617F-JAK2 no aumento da ativação de plaquetas e leucócitos, bem como o papel dessas alterações na fisiopatologia dos eventos trombóticos nas NMPs são ainda questões em aberto.

Tabela 5: Características principais dos estudos que analisaram a V617F-JAK2 em pacientes com trombose de veias esplâncnicas ou cerebrais

Estudo	Desenho do estudo	Critérios de exclusão	Localização da trombose e casuística	NMP*	Tipo de amostra	Método(s)	Prevalência da V617F-JAK2 (%)
Patel e cols, 2006 ¹⁴¹	Caso-controle	Cirrose	SBC idiopática: 41	0	Lâmina MO; leucócitos	AS-PCR + Seq	24/41 (58)
De Stefano e cols, 2007 ¹⁵⁴	Retrospectivo	Câncer; cirrose	TVE: 94	15	Granulócitos	AS-PCR + Seq	32/94 (34); 17/79 (21,5) nos pacientes sem NMP
Primignani e cols, 2006 ¹⁵⁵	Caso-controle	Câncer; cirrose	TP: 73 SBC: 20	0	Granulócitos	RFLP-PCR + AS-PCR	34/93 (36,5) – TP: 26/73 (35,6); SBC 8/20 (40)
Goulding e cols, 2008 ¹⁵⁶	Retrospectivo	NMP e todas as causas de trombofilia	TVE: 19	0	Leucócitos	RFLP-PCR + AS-PCR	14/19 (74)
Regina e cols, 2007 ¹⁵⁷	Caso-controle	Câncer; cirrose infecções	TP: 42 SBC: 2	0	Leucócitos	AS-PCR + RFLP-PCR	8/44 (18)
Rossi e cols, 2007 ¹⁵⁸	Retrospectivo	Todas as causas de trombofilia	TVE idiopática: 6 TVC: 13	0	Granulócitos	AS-PCR	TVE: 3/6 (50) TVC: 0/13
Colaizzo e cols, 2007 ¹⁵⁹	Caso-controle	Câncer; cirrose	TVE: 139 TVC: 45	21	Leucócitos	RFLP-PCR + Seq	TVE: 27/139 (21); 14/118 (12) nos pacientes sem NMP. TVC: 0/45
Bellucci e cols, 2008 ¹⁶⁰	Retrospectivo	NMP	TVC: 87	0	Granulócitos	PCR em tempo real	1/87 (1)
De Stefano e cols, 2008 ¹⁶¹	Retrospectivo	NMP	TVC: 48	0	Granulócitos	AS-PCR + Seq	3/48 (6)
Pardanani e cols, 2008 ¹⁶⁶	Retrospectivo	NMP; TVE	TVC: 7	0	Leucócitos	AS-PCR	1/7 (14)
Abel e cols, 2008 ¹⁶⁷	Retrospectivo	FV Leiden; FII G20210A; câncer; NMP; TIH	TVE: 7	1	-	AS-PCR	1/7 (14)
Boissinot e cols, 2007 ¹⁷²	Retrospectivo	Nenhum	TVE: 45	-	Lâmina MO; granulócitos	AS-PCR	14/45 (31)
Smalberg e cols, 2007 ¹⁷³	Retrospectivo	Câncer	SBC: 40	13	-	PCR	7/17 testados (41)
McMahon e cols, 2007 ¹⁷⁴	Caso-controle	Nenhum	TVE: 24	2	Leucócitos	AS-PCR	5/24 (21); 3/22 (14) nos pacientes sem NMP
Bayraktar e cols, 2007 ¹⁷⁵	Retrospectivo	TP aguda ou subaguda (3 meses), cirrose e câncer	TP: 25	6	Leucócitos	AS-PCR	6/25 (24); 5/19 (26) nos pacientes sem NMP
Kiladjian e cols, 2007 ¹⁷⁶	Retrospectivo	Câncer; cirrose	TP: 137 SBC: 104	0	Leucócitos e granulócitos	PCR em tempo real	94/241 (39) – TP: 47/137 (34); SBC: 47/104 (45)
Colaizzo e cols, 2008 ¹⁷⁷	Retrospectivo	Nenhum	SBC: 32	14	Leucócitos	RFLP-PCR	11/32 (34); 3/20 (15) nos pacientes sem NMP

AS-PCR, PCR alelo-específica; FII, fator II; FV, fator V; MO, medula óssea; NMP, neoplasia mieloproliferativa; PCR, reação em cadeia da polimerase; RFLP-PCR, PCR do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição; SBC, Síndrome de Budd-Chiari; Seq, seqüenciamento; TIH, trombocitopenia induzida por heparina; TP, trombose da veia porta; TVC, trombose venosa cerebral; TVE, trombose venosa esplâncnica.

*número de pacientes com diagnóstico de NMP no momento da trombose.

Tabela 6: Características principais dos estudos que analisaram a V617F-JAK2 em pacientes com AVEi, IAM, trombose arterial periférica ou com trombose venosa de outras localizações

Estudo	Desenho do estudo	CrITÉrios de exclusão	Localização da trombose e casuística	NMP*	Tipo de amostra	Método(s)	Prevalência da V617F-JAK2 (%)
Regina e cols, 2007 ¹⁵⁷	Caso-controle	Câncer; cirrose; infecções	TVP mmii idiopática: 44	0	Leucócitos	RFLP-PCR + AS-PCR	0/44
Rossi e cols, 2007 ¹⁵⁸	Retrospectivo	Todas as causas de trombofilia	TVP mmii: 61; TEP: 53; TVR: 6	0	Granulócitos	AS-PCR	0/120
Collaizzo e cols, 2007 ¹⁵⁹	Caso-controle	Câncer	TVP mmii: 110 TVR: 93	0	Leucócitos	RFLP-PCR + Seq	0/203
Remacha e cols, 2007 ¹⁶⁴	Caso-controle	Câncer; idade > 70 anos Insuficiência hepática; Síndrome nefrótica	Trombose de sítios usuais: 295	0	-	AS-PCR	1/295 (0,3)
Sène e cols, 2008 ¹⁶⁵	Retrospectivo	Câncer; NMP; TVE TVC	Trombose arterial idiopática: 16 Trombose venosa idiopática: 44	0	Leucócitos	PCR em tempo real	0/60
Pardanani e cols, 2008 ¹⁶⁶	Retrospectivo	NMP; TVE	TVC: 7 OVCR: 7 TVP mmii: 84 TEP: 76 TVP mmii +TEP: 36 AVEi: 136 Outras: 27 IAM < 50 anos: 28 TEV recorrente: 197	0	Leucócitos	AS-PCR	6/664 (0,9) – TVC: 1/7; OVCR: 1/7; TEP: 1/76; TVP+TEP: 1/36; AVEi: 1/136; TEV recorrente: 1/197
Abel e cols, 2008 ¹⁶⁷	Retrospectivo	FV Leiden; FII G20210A; câncer; NMP; TIH	TVP/TEP: 45 AVEi: 10	0	-	AS-PCR	0/55
Ugo e cols, 2008 ¹⁶⁸	Prospectivo caso-controle	Câncer	TEV idiopático: 394	2	Leucócitos	AS-PCR + PCR em tempo real	6/394 (1,5); 4/392 (1) nos pacientes sem NMP
Smalberg e cols, 2008 ¹⁶⁹	Caso-controle	NMP	Trombose arterial (periférica/AVEi/IAM): 93	0	-	PCR	0/93
Za e cols, 2009 ¹⁷⁰	Caso-controle	Câncer; NMP Idade < 18 anos	TEV idiopático (TVP mmii e/ou TEP): 194	0	Granulócitos	AS-PCR + Seq	2/194

AS-PCR, PCR alelo-específico; AVEi, acidente vascular encefálico isquêmico; FII, fator II; FV, fator V; IAM, infarto agudo do miocárdio; NMP, neoplasia mieloproliferativa; OVCR, oclusão da veia central da retina; PCR, reação em cadeia da polimerase; RFLP-PCR, PCR do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição; Seq, seqüenciamento; TEP, tromboembolismo pulmonar; TEV, tromboembolismo venoso; TIH, trombocitopenia induzida por heparina; TVC, trombose venosa cerebral; TVP mmii, trombose venosa profunda de membros inferiores; TVR, trombose venosa retiniana.

*número de pacientes com diagnóstico de NMP no momento da trombose.

III – Objetivos

III.1. Objetivos gerais

- Verificar a prevalência da mutação V617F-JAK2 em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico.

- Verificar a prevalência da mutação V617F-JAK2 em pacientes com trombose venosa cerebral.

- Verificar a prevalência da mutação V617F-JAK2 em pacientes com trombose venosa esplâncnica (trombose da veia porta ou síndrome de Budd-Chiari).

III.2. Objetivos específicos

- Padronizar o método de PCR alelo-específica (AS-PCR) para a detecção da mutação V617F-JAK2.

- Padronizar o método de PCR baseada no sistema de mutação refratário à amplificação (ARMS-PCR), usando iniciadores marcados e eletroforese capilar para a quantificação alélica dos pacientes com a mutação V617F-JAK2.

- Correlacionar a presença da mutação V617F-JAK2 com a presença de fatores de risco protrombóticos nos pacientes com trombose esplâncnica.

- Avaliar a utilidade da pesquisa da V617F-JAK2 no diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas latentes em contextos variados de trombose.

IV. Pacientes e métodos

IV.1. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HUCFF-UFRJ (Protocolo de Pesquisa nº 135/07) e da UFMG (parecer nº 531/06).

O estudo teve o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e da *Swiss Bridge Foundation* (Projeto "*Molecular Heterogeneity of Leukaemias and Lymphomas*").

IV.2. População de estudo

Foram estudados 514 pacientes com diagnóstico de acidente vascular encefálico isquêmico, trombose venosa cerebral, trombose da veia porta e síndrome de Budd-Chiari, encaminhados ao Laboratório de Hemostasia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – HUCFF/UFRJ e ao Laboratório de Diagnóstico Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – FF/UFMG, para avaliação de risco trombótico.

Para cada paciente foi preenchido um questionário (Anexos 1 e 2) contendo dados clínicos e informações referentes à presença de fatores de risco para acidente vascular encefálico isquêmico, trombose venosa cerebral, trombose da veia porta ou síndrome de Budd-Chiari, conforme adequado.

IV.2.1. Pacientes com AVEi ou TVC

Foram estudados 381 pacientes com AVEi ou TVC encaminhados ao Laboratório de Hemostasia do HUCFF-UFRJ no período de janeiro de 2000 a julho de 2007 e ao Laboratório de Diagnóstico Molecular da FF-UFMG no período de janeiro de 2004 a julho de 2007, para avaliação de risco trombótico.

IV.2.1.1. Critérios de inclusão

- a) Idade maior que 15 anos.
- b) Diagnóstico de AVEi e TVC realizado nos serviços de origem, baseado em dados clínicos e radiológicos (tomografia computadorizada, ressonância magnética ou venografia com ressonância magnética). Em alguns casos, uma avaliação completa foi realizada, incluindo ecocardiograma, ecodoppler de vasos extracranianos e arteriografia aortocraniana.

IV.2.1.2. Critérios de exclusão

- a) Pacientes com diagnóstico prévio de neoplasia mieloproliferativa crônica.
- b) Pacientes com dados clínicos e/ou radiológicos incompletos.
- c) Ausência de amostra de DNA viável para análise.

IV.2.2. Pacientes com trombose venosa esplâncnica

Foram estudados 133 pacientes com TP ou SBC encaminhados ao Laboratório de Hemostasia do HUCFF-UFRJ no período de janeiro de 2000 a março de 2008 e ao Laboratório de Diagnóstico Molecular da FF-UFMG no período de janeiro de 2004 a julho de 2008, para avaliação de risco trombótico.

IV.2.2.1. Critérios de inclusão

- a) Idade maior que 15 anos.
- b) Diagnóstico de trombose venosa esplâncnica realizado nos serviços de origem, baseado em dados clínicos e radiológicos (ultra-sonografia com Doppler, tomografia computadorizada ou ressonância magnética).

IV.2.2.2. Critérios de exclusão

- a) Pacientes com câncer de fígado, pâncreas ou de vias biliares.
- b) Pacientes com dados clínicos e/ou radiológicos incompletos.
- c) Ausência de amostra de DNA viável para análise.

IV.3. Métodos

IV.3.1. Tipo de estudo

Este foi um estudo retrospectivo. O diagnóstico foi realizado nos serviços de origem e as informações sobre o quadro clínico, exames de imagem, avaliação laboratorial e a evolução dos pacientes foram obtidas pela análise dos prontuários e consulta ao médico assistente, quando necessário.

IV.3.2. Definições

IV.3.2.1. Fatores de risco

As seguintes variáveis foram investigadas como fatores de risco nos pacientes com trombose venosa esplâncnica:

Fatores adquiridos

- **Uso de anticoncepcionais orais:** uso de anticoncepcional oral no momento da trombose ou até menos de um ciclo menstrual.
- **Pós-operatório de cirurgia abdominal:** cirurgia realizada nos três meses que antecederam o episódio de TP ou SBC.
- **Trauma abdominal:** trauma ocorrido no mês que antecedeu o episódio de TP ou SBC.
- **Esquistossomose mansônica, cirrose hepática, hepatites e outras doenças hepáticas:** diagnóstico realizado nos serviços de origem.
- **Síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAF):** diagnóstico realizado nos serviços de origem, de acordo com critérios previamente estabelecidos.¹⁷⁸
- **NMP:** diagnóstico realizado nos serviços de origem, de acordo com critérios previamente estabelecidos.³

Fatores hereditários

- **Fator V Leiden (mutação G1691A do fator V) e protrombina G20210A (mutação G20210A da protrombina):** de acordo com resultados prévios do paciente.

- Os níveis de Antitrombina, Proteína C e Proteína S encontram-se freqüentemente alterados em pacientes com comprometimento da função hepática e, por isso, os resultados disponíveis não foram considerados.

Os fatores de risco para AVEi e TVC foram avaliados apenas nos casos positivos para a mutação V617F-JAK2.

IV.3.2.2. Tempo de acompanhamento

O tempo de acompanhamento dos pacientes com trombose venosa esplâncnica foi calculado a partir da data da trombose (ou data de entrada no estudo, naqueles pacientes em que a trombose ocorreu antes do início do estudo) até a data da última visita de acompanhamento ou do óbito.

O tempo de acompanhamento dos pacientes com AVEi ou TVC foi avaliado apenas nos casos positivos para a mutação V617F-JAK2.

IV.3.3. Métodos estatísticos

A existência de associações entre variáveis categóricas foi analisada com o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. As comparações de distribuição de valores entre variáveis contínuas foram analisadas com o teste de Mann-Whitney. Os testes estatísticos foram realizados usando o programa SPSS, versão 13.0 (*Statistical Package for the Social Sciences, version 13.0*) (SPSS Inc., Chicago, EUA). Um valor $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

IV.3.4. Estudo laboratorial

IV.3.4.1. Características das amostras

Foram estudadas amostras de DNA arquivadas nos Laboratórios de Hemostasia do HUCFF-UFRJ e de Diagnóstico Molecular da FF-UFMG, além de amostras de sangue venoso dos pacientes incluídos após julho de 2007. Sempre que necessário, foi colhida uma nova amostra dos pacientes já em acompanhamento.

Como controles positivos, foram analisadas isoladamente amostras de 20 pacientes com diagnóstico prévio de policitemia vera. Como controles negativos, foram analisadas isoladamente amostras de DNA de 30 indivíduos saudáveis arquivadas no Laboratório de Hemostasia do HUCFF-UFRJ.

IV.3.4.2. Extração de DNA

O DNA utilizado como material primário neste estudo foi extraído de leucócitos de sangue venoso colhido em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). As amostras de DNA foram extraídas usando o *kit QIAamp DNA Blood Mini Kit*[®] (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

A) Isolamento de DNA de alto peso molecular pelo *QIAamp DNA Blood Mini Kit*[®]

Em um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL, 20 µL de proteinase K foram adicionados a um volume de 200 µL de sangue venoso. Em seguida, foram acrescentados 200 µL do tampão de lise de hemácias (tampão AL), essa solução foi misturada no vórtex por 15 segundos e incubada por 10 minutos, a 56°C. Foram adicionados 200 µL de etanol absoluto e novamente a solução misturada no vórtex por 15 segundos e gentilmente para a retirada de gotículas da tampa do tubo. Em seguida a mistura foi transferida para uma coluna de sílica posicionada em um tubo coletor e centrifugada a 8000 rpm, durante 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e, à coluna de sílica posicionada em um novo tubo coletor foram adicionados 500 µL

de tampão AW1. Após 1 minuto de centrifugação a 8000 rpm, o líquido filtrado foi desprezado. Novamente o tubo coletor foi descartado e, à coluna de sílica posicionada em um novo tubo coletor foram adicionados 500 µL de tampão AW2. Após 3 minutos de centrifugação a 14000 rpm, o líquido filtrado foi desprezado. A coluna de sílica foi posicionada em novo tubo coletor e centrifugada a 14000 rpm, durante 1 minuto e, em seguida, posicionada em novo tubo coletor, ao qual foram adicionados 200 µL de tampão de eluição (tampão AE). Após 1 minuto de incubação à temperatura ambiente, procedeu-se à centrifugação a 8000 rpm, durante 1 minuto e o filtrado foi armazenado a -20°C , para posterior pesquisa da mutação.

B) Quantificação do DNA extraído

A quantificação do DNA foi realizada por leituras a 260 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Biophotometer (*Eppendorf*). Considerou-se uma unidade de densidade ótica (DO) como equivalente a 50 µg/mL para DNA de dupla fita.¹⁷⁹ A pureza das amostras foi avaliada por leitura a 280 nm (faixa de absorção das proteínas), considerando-se como pura uma amostra de DNA com valor DO 260/DO 280 entre 1,8 e 2,0.

IV.3.4.3. Análise molecular

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea do Instituto Nacional de Câncer (CEMO-INCa) e no Setor de Biologia Molecular do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG).

As amostras dos pacientes incluídos no estudo foram avaliadas para a detecção da mutação V617F-JAK2 por métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR).

A) AS-PCR para a detecção da mutação V617F-JAK2

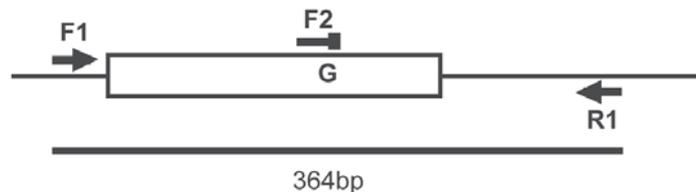
Inicialmente, todas as amostras foram avaliadas pelo método de AS-PCR, que possibilita a discriminação entre as duas variantes alélicas. O método consiste

em um sistema de três iniciadores, sendo um anti-senso comum, um senso específico para a mutação e outro iniciador senso que amplifica tanto o DNA selvagem quanto o mutado e serve de controle interno para a reação.

Foram utilizados iniciadores previamente descritos por Baxter e cols.⁵ para a amplificação do exon 14 do gene *JAK2*. Para maximizar a especificidade do iniciador específico para a mutação, os autores introduziram um pareamento incorreto (*mismatch*) no antepenúltimo nucleotídeo da porção 3'. O princípio do método e as seqüências dos iniciadores usados são mostrados na Figura 4.

A

Seqüência selvagem



Seqüência com a V617F-*JAK2*

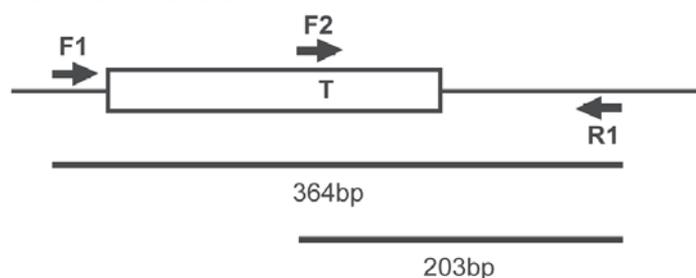


Figura 4: AS-PCR para a detecção da V617F-*JAK2*.

A. Princípio do método. Uma seqüência selvagem gera um produto de 364 pb, resultado da amplificação entre os iniciadores F1 e R1. Uma seqüência com a V617F gera o mesmo produto de 364 pb, pela amplificação entre os iniciadores F1 e R1, e um produto de 203 pb, resultado da amplificação entre os iniciadores F2 e R1.

B

Nome	Seqüência (5'→3')
F1	ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG
F2	AGCATTGGTTTTAAATTATGGAGTATa <u>T</u>
R1	CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA

B. Nomes e seqüências dos iniciadores utilizados. Pareamento incorreto intencional no iniciador F2, evidenciado em letra minúscula e nucleotídeo genótipo-específico sublinhado.

Foram amplificados 100 ng de DNA substrato num volume final de 50 μ L, contendo 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl e pH 8.3 (tampão Invitrogen); 1,5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen); 200 μ M de cada dNTP (Pharmacia); iniciador R1 (1 μ M), iniciadores F1 e F2 (0,5 μ M de cada); 2 U de *Taq* DNA-polimerase Platinum (Invitrogen) e água deionizada estéril para completar o volume.

A reação consistiu de incubação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com etapa de extensão final de 72°C por 6 minutos. Foi utilizado um termociclador Mastercycler Gradient™ (Eppendorf).

Os resultados foram avaliados em gel de agarose 3%, contendo 0.5 μ g/mL de brometo de etídeo (Invitrogen) e visualizados sob luz ultravioleta.

Em todos os experimentos foram utilizados controles negativos e controles positivos (mencionados acima) e controles de reação (contendo todos os componentes da reação de PCR com exceção do DNA substrato).

B) ARMS-PCR para a quantificação alélica dos pacientes com a mutação V617F-JAK2

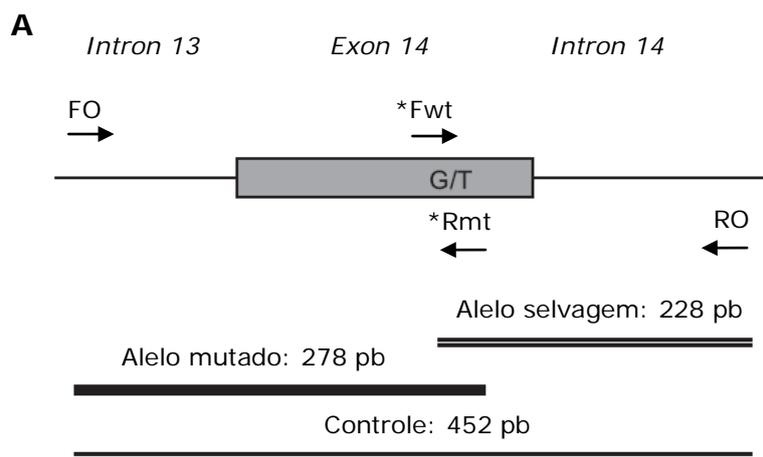
A reação de PCR baseada no sistema de mutação refratário à amplificação (ARMS-PCR) é um método de AS-PCR que utiliza dois pares de iniciadores, permitindo amplificar especificamente as duas seqüências (normal e mutada) na presença da troca de um único nucleotídeo, além de um controle interno, numa única reação.¹⁸⁰ Para tanto, somente o nucleotídeo terminal 3' de um dos iniciadores de cada par é alelo-específico, ou seja, o iniciador específico para a seqüência "normal" é refratário à amplificação do DNA mutado e vice-versa.

Para a quantificação alélica dos pacientes com a mutação V617F-JAK2, foram usados iniciadores desenhados por Jones e cols.,⁶⁷ com uma modificação nos dois iniciadores genótipo-específicos, que foram marcados com o fluorocromo 6-FAM, para permitir a posterior mensuração da carga alélica após eletroforese

capilar.¹⁸¹ Para maximizar a especificidade alélica, os autores introduziram pareamentos incorretos no antepenúltimo nucleotídeo a partir da porção 3' de cada iniciador genótipo-específico.⁶⁷ O princípio do método, as seqüências e o posicionamento dos iniciadores são mostrados na Figura 5.

A amplificação foi realizada por 30 ciclos a 56°C, usando a *Taq* DNA-polimerase Platinum (Invitrogen).

Os produtos fluorescentes foram analisados em um seqüenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom) usando o programa GeneScan. As porcentagens de alelo mutado e selvagem foram estimadas pela comparação das respectivas áreas dos picos gerados, com a soma de ambas, considerada como 100%.



B

Nome	Seqüência (5'→3')	Posição
FO	TCCTCAGAACGTTGATGGCAG	88274-88294
RO	ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT	88704-88726
Fwt	FAM-GCATTGGTTTTAAATTATGGAGTATa <u>TG</u>	88498-88523
Rmt	FAM-GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAa <u>AA</u>	88529-88552

Figura 5: ARMS-PCR para a detecção da V617F-JAK2.

A. Os iniciadores FO e RO flanqueiam o exon 14 do gene JAK2, resultando em uma banda de 452 pb, que serve de controle interno da reação. RO e Fwt amplificam o alelo selvagem, gerando uma banda de 228 pb; e FO e Rmt geram uma banda de 278 pb correspondente ao alelo mutado.

* indica marcação com 6-FAM.

B. Nomes, seqüências e posicionamento dos iniciadores utilizados. Os pareamentos incorretos intencionais são evidenciados em letra minúscula e os nucleotídeos genótipo-específicos estão sublinhados.

V. Resultados

V.1. Padronização dos métodos baseados na PCR

V.1.1. AS-PCR para a detecção da V617F-JAK2

As condições de reação usadas para a AS-PCR foram as sugeridas por Baxter e cols.,⁵ sem modificações adicionais, conforme descrito na seção de Pacientes e métodos (página 38).

Nos indivíduos sem a mutação, foi visualizada uma banda única de 364 pb, também utilizada como controle interno da reação, com o objetivo de descartar falsos negativos. Nos indivíduos com a mutação V617F, foram visualizadas duas bandas: uma gerada pelo mesmo produto de 364 pb e outra, de 203 pb, correspondente ao alelo mutado. A Figura 6 exemplifica os resultados da AS-PCR para a detecção da V617F-JAK2.

O limite de detecção do alelo mutado foi de 1%, observado a partir de curva de diluição gerada usando DNA plasmidial contendo as seqüências mutada e selvagem misturadas em proporções variadas (Figura 7).

Figura 6: Detecção da V617F-JAK2 por AS-PCR

Linha 1 – controle positivo para a V617F. **2, 4 e 5** - pacientes positivos para a V617F-JAK2; **3** - paciente negativo para a V617F-JAK2; **PM** - controle de peso molecular 100 pb. Agarose 3%.

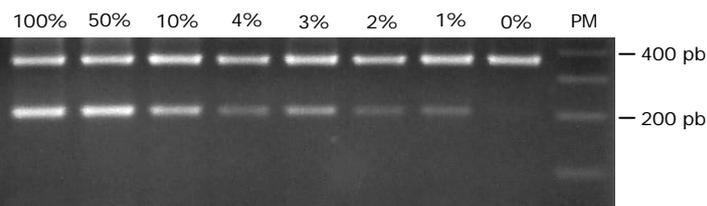
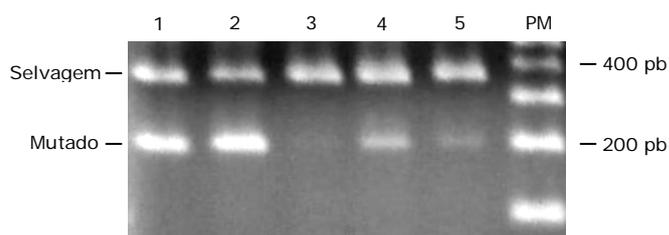


Figura 7: Limite de detecção da AS-PCR para a V617F-JAK2 – Curva de diluição

Detecção em gel de agarose dos produtos da AS-PCR gerados por diluições seriadas dos plasmídeos, com as respectivas porcentagens. As porcentagens indicam a quantidade de alelo mutado. PM: controle de peso molecular 100 pb. Agarose 3%.

V.1.2. ARMS-PCR para a quantificação alélica dos pacientes com a V617F-JAK2

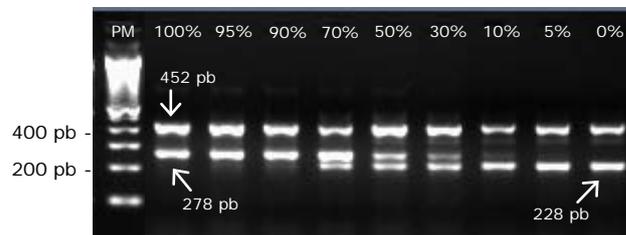
Para a padronização do método, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (53°C; 54°C; 55°C; 55,5°C e 56°C) e a temperatura ótima foi de 56°C. As condições de reação foram descritas na seção de Pacientes e métodos (página 39).

Nos indivíduos sem a mutação, foram visualizadas duas bandas, uma de 452 pb, também utilizada como controle interno da reação, com o objetivo de descartar falsos negativos, e uma banda de 228 pb, correspondente à amplificação do alelo selvagem. Nos indivíduos com a mutação V617F, foram visualizadas três bandas: a de 452 pb; outra gerada pelo mesmo produto de 228 pb correspondente ao alelo selvagem; e a terceira, de 278 pb, correspondente ao alelo mutado.

Uma curva padrão foi gerada usando dois plasmídeos obtidos por clonagem da seqüência de 452 pb, um contendo a seqüência mutada e outro a seqüência selvagem, misturados em diluições variadas. O coeficiente de correlação linear ao quadrado (R^2) obtido foi maior que 0,99. O limite de detecção do alelo mutado foi de 2%. A Figura 8 mostra os resultados da ARMS-PCR obtidos para a curva de diluição: (A) Corrida dos produtos fluorescentes em gel de agarose; (B) Valores das áreas dos picos gerados pela leitura da fluorescência e cálculo das porcentagens de alelo mutado; (C) Gráfico com os resultados, a linha de tendência e o R^2 ; e (D) Eletroferogramas, que são a representação gráfica da leitura da fluorescência pelo seqüenciador. No exemplo, estão os eletroferogramas obtidos para os pontos de diluição correspondentes a 100%, 50% e 0% de alelo mutado.

O cálculo da porcentagem de alelo mutado foi feito pela comparação entre o valor da área do pico correspondente ao alelo mutado, em relação à soma das áreas (alelo mutado e selvagem), conforme a fórmula a seguir:

$$\% \text{ alelo mutado} = \frac{\text{Área alelo mutado (banda de 278 pb)} + \text{Área alelo selvagem (banda de 228 pb)}}{\text{Soma das duas áreas}}$$

A**B**

Ponto da curva	Área alelo selvagem	Área alelo mutado	Porcentagem alelo mutado	Porcentagem teórica de alelo mutado
1	0	12250,5	100	100
2	1221,2	12902,6	91,35	95
3	1524,9	9501,5	86,17	90
4	5167,1	8882	63,22	70
5	6562,3	5297,9	44,66	50
6	10183,7	4057,3	28,49	30
7	12564,4	1547,9	10,96	10
8	9438,6	519,3	5,57	5
9	16546,9	0	0	0

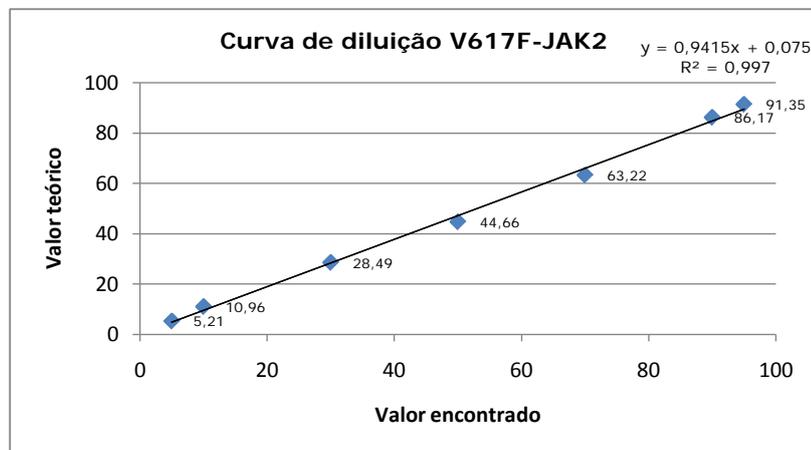
C

Figura 8: Padronização da ARMS-PCR para a V617F-JAK2 – Curva de diluição

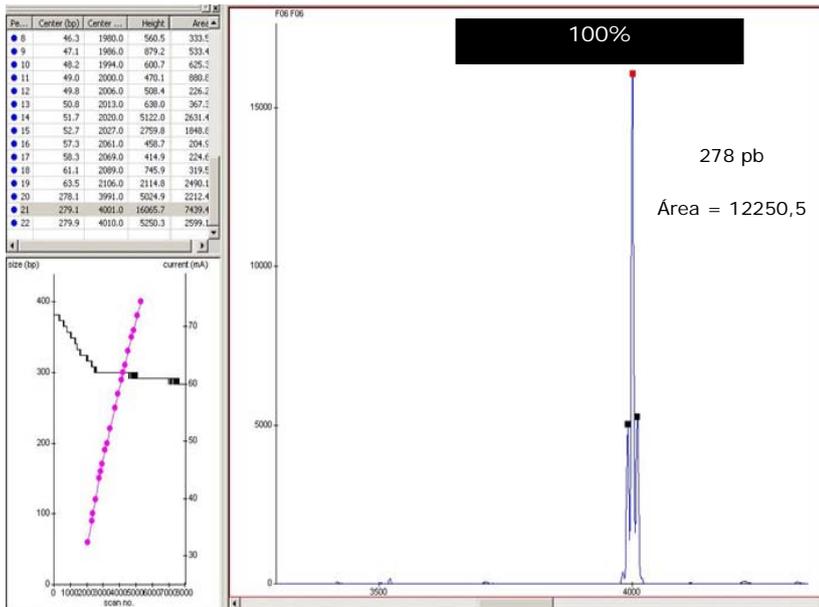
A. Detecção em gel de agarose dos produtos da ARMS-PCR gerados pelas diluições seriadas dos plasmídeos, com as respectivas percentagens. As percentagens indicam a quantidade de alelo mutado. PM: controle de peso molecular 100 pb. Agarose 3%.

B. Cálculos para a obtenção das percentagens de alelo mutado, a partir das áreas dos picos gerados pela leitura no seqüenciador.

C. Representação gráfica da curva de diluição de DNA plasmidial, comparada aos valores teóricos correspondentes; linha de tendência e R^2 .

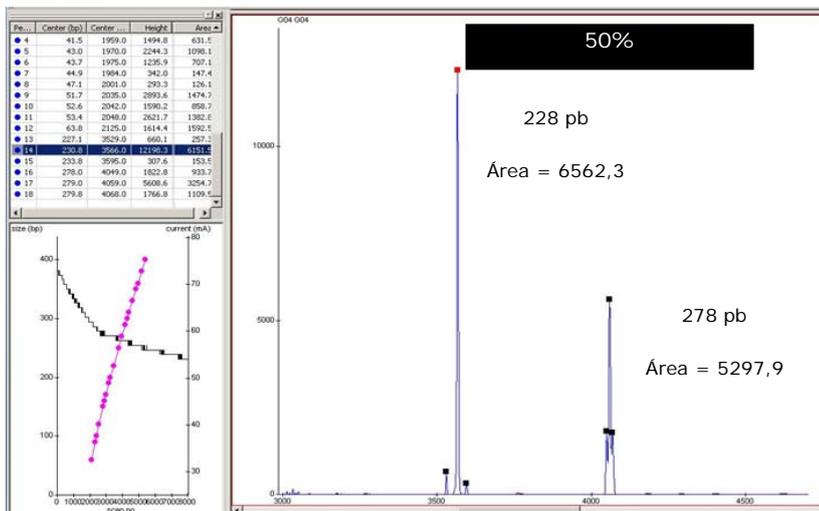
D. Eletroferogramas obtidos para os pontos correspondentes a 100%, 50% e 0% de alelo mutado.

D



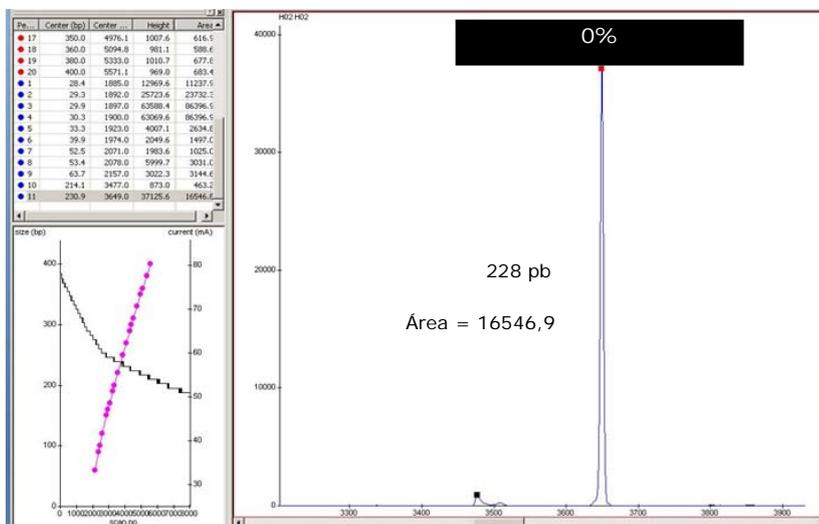
Cálculo:

$$\% \text{ alelo mutado} = \frac{[12250,5 / (12250,5 + 0)] \times 100}{100} = 100\%$$



Cálculo:

$$\% \text{ alelo mutado} = \frac{[5297,9 / (5297,9 + 6562,3)] \times 100}{100} = 44,66\%$$



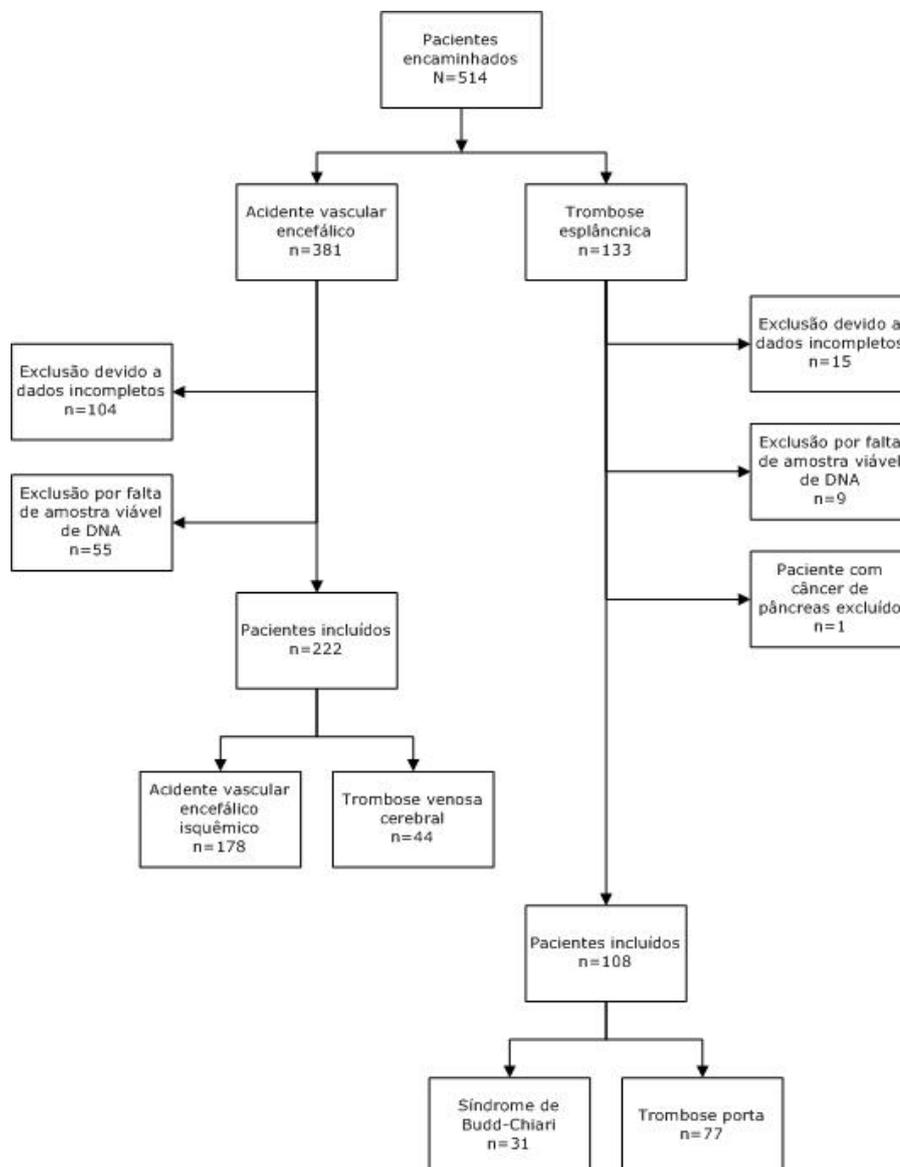
Cálculo:

$$\% \text{ alelo mutado} = \frac{[0 / (0 + 16546,9)] \times 100}{100} = 0\%$$

V.2. Pacientes com AVEi ou TVC

Um total de 381 pacientes com AVEi ou TVC foram encaminhados para avaliação de risco trombótico no Laboratório de Hemostasia do HUCFF-UFRJ (n=322) ou no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG (n=59). Foram excluídos 104 pacientes por dados clínicos e/ou radiológicos incompletos, e outros 55 por falta de amostra de DNA amplificável e impossibilidade de nova coleta. Ao final, 222 pacientes foram incluídos na análise, sendo 178 pacientes com AVEi e 44 com TVC (Figura 9).

Figura 9: Representação esquemática da casuística



V.2.1. Características gerais

As características demográficas e o status mutacional dos pacientes com AVEi ou com TVC são apresentados na Tabela 7.

No grupo de pacientes com AVEi, a mediana de idade foi 37 anos (15-76) e 57% eram do gênero feminino. A mutação V617F-JAK2 foi detectada em dois (1%) dos 178 pacientes com AVEi, ambos considerados como de etiologia indeterminada após investigação completa, segundo a classificação TOAST.¹²¹ Considerando somente os pacientes com AVEi de etiologia indeterminada após investigação completa, a prevalência foi de 2/70 (2,8%).

Os 44 pacientes com TVC tinham uma mediana de idade de 28 anos (15-65) e 68% eram do gênero feminino. Nenhum deles apresentou a mutação V617F-JAK2.

Tabela 7: Características dos 222 pacientes com AVEi ou TVC incluídos no estudo

	AVEi	TVC
Pacientes (N)	178	44
Gênero (F/M)	102/76	30/14
Idade mediana, anos (intervalo)	37 (15-76)	28 (15-65)
V617F-JAK2 (%)	2 (1)	0

AVEi, acidente vascular encefálico isquêmico; TVC, trombose venosa cerebral.

V.2.2. Pacientes com AVEi e com a V617F-JAK2

Caso 1: Homem de 49 anos com história de um AVEi em 2002, sem evidência de esplenomegalia e com investigação para trombofilia negativa. O hemograma realizado na época do AVEi era normal. Entretanto, nova análise do hemograma realizada em julho de 2007, após a detecção da mutação V617F-JAK2, mostrou leve trombocitose ($550 \times 10^9/L$; VR: $150-450 \times 10^9/L$), com hemoglobina e

contagem de leucócitos dentro do intervalo de referência. Também em julho de 2007, foi realizada biópsia de medula óssea que evidenciou celularidade normal, com agrupamentos de megacariócitos de morfologia normal. A porcentagem de alelo mutado detectada foi de 13%.

Caso 2: Mulher de 68 anos, com história de 3 episódios de AVEi (em 1997, 2003 e 2007) e sem evidência de esplenomegalia. Na investigação para trombofilia, foi detectada homozigose para o polimorfismo C677T do gene da metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR 677TT), além de elevação dos níveis de homocisteína plasmática (30 $\mu\text{M/L}$; VR: 5-14 $\mu\text{M/L}$) na época do segundo AVEi. Recebeu tratamento de reposição com ácido fólico, entre o segundo e terceiro AVEi, com normalização dos níveis plasmáticos de homocisteína. No hemograma da época do terceiro AVEi, a única anormalidade observada foi anemia normocítica e normocrômica (Hb: 8,9 g/dL; VR: 12-15,5 g/dL), sem alterações à hematoscopia, associada a níveis elevados de eritropoietina (52,6 mUI/mL; VR: 4-20 mUI/mL). A porcentagem de alelo mutado detectada foi de 16%. Atualmente a paciente está em coma, não sendo possível avaliar a medula óssea por razões éticas.

V.3. Pacientes com trombose venosa esplâncnica

Foram analisados 133 pacientes com diagnóstico de trombose venosa esplâncnica. Foi excluído um paciente com câncer de pâncreas, 15 devido a dados clínicos e/ou radiológicos incompletos e nove pacientes por falta de amostra de DNA amplificável para análise e impossibilidade de nova coleta, sendo incluídos ao final 108 pacientes (31 com SBC e 77 com TP) (Figura 9). Desses, 20 apresentavam diagnóstico de cirrose hepática. Alguns pacientes apresentavam trombose de mais de uma localização, por ocasião do diagnóstico de imagem: 22 apresentavam TP associada a trombose de veia mesentérica e/ou de veia esplênica,

e quatro pacientes apresentavam SBC associada a TP e foram analisados no grupo da SBC.

V.3.1. Características gerais

As características demográficas, os fatores protrombóticos investigados e os resultados da pesquisa da V617F-JAK2 são apresentados na Tabela 8. Foram estudados 57 pacientes do gênero feminino e 51 do masculino, com idade mediana de 39 anos (17-74). Um ou mais fatores de risco para trombose esplâncnica foram identificados em 63% dos pacientes. Dentre os fatores protrombóticos adquiridos, os mais freqüentes foram: cirrose hepática; outras doenças hepáticas crônicas (incluindo seis pacientes com esquistossomose hepato-esplênica); pós-operatório de cirurgia abdominal (incluindo sete pacientes pós-esplenectomia) e uso de contraceptivos orais. A síndrome do anticorpo antifosfolípide foi identificada em 2 de 52 pacientes testados. Trombofilia hereditária foi identificada em 11 pacientes: seis com Fator V Leiden e cinco com protrombina G20210A (todos em heterozigose). Dos 108 pacientes, quatro apresentavam diagnóstico de NMP antes do episódio trombótico e cinco foram diagnosticados com NMP durante a investigação da trombose venosa esplâncnica. Nove pacientes apresentaram dois ou mais fatores de risco protrombóticos adquiridos e/ou hereditários.

A mutação V617F-JAK2 foi detectada em 24 (22%) dos 108 pacientes, sendo 8/31 (26%) pacientes com SBC e 16/77 (21%) pacientes com TP. Dentre os pacientes sem NMP (n=99), 15 (15%) apresentaram a mutação. Dentre os pacientes não-cirróticos (n=88), 22 (25%) apresentaram a mutação.

Tabela 8: Características demográficas, fatores de risco protrombóticos e status mutacional para a V617F-JAK2 dos 108 pacientes com TVE

	SBC	TP
Pacientes, N	31	77
Gênero (F/M)	20/11	37/40
Idade mediana, anos (intervalo)	33 (17-50)	42 (17-74)
Fatores de risco adquiridos		
Cirrose hepática	7	13
Outras doenças hepáticas crônicas	0	13
Cirurgias abdominais	0	12
Uso de contraceptivo oral	7	4
NMP	5	4
SAF	1	1
Trauma abdominal	0	1
Sepse	0	1
Fatores de risco hereditários		
Fator V Leiden	3	3
Protrombina G20210A	1	4
Status mutacional V617F-JAK2		
V617F-JAK2, todos os pacientes (%)	8 (26)	16 (21)
V617F-JAK2, excluídos os pacientes com NMP (%)	3 (11)	12 (16)

NMP, neoplasia mieloproliferativa; SAF, síndrome do anticorpo antifosfolípide; SBC, síndrome de Budd-Chiari; TP, trombose porta; TVE: trombose venosa esplâncnica.

Os pacientes com a mutação apresentaram uma contagem de leucócitos mediana significativamente maior que os sem a mutação ($9,3 \times 10^9/L$ vs. $5,4 \times 10^9/L$; $p < 0,001$), bem como uma contagem mediana de plaquetas

significativamente maior ($477,5 \times 10^9/L$ vs. $141 \times 10^9/L$; $p < 0,001$). Essas diferenças permaneceram quando foram retirados da análise os pacientes esplenectomizados e com NMP. A frequência de fatores protrombóticos (adquiridos e hereditários) foi similar nos grupos com e sem a mutação (71% vs. 61%). A Tabela 9 mostra uma análise comparativa entre os pacientes com e sem a mutação V617F-JAK2.

Tabela 9: Características dos pacientes com e sem a mutação V617F-JAK2

	V617F-JAK2 +	V617F-JAK2 -	<i>p</i>
Gênero (F/M)	16/8	41/43	0,1
Idade mediana (anos)	42	38,5	0,4
Presença de fatores protrombóticos (%)	17/24 (71)	51/84 (61)	0,3
Dosagem mediana de hemoglobina	12,8 g/dL	13,2 g/dL	0,6
Contagem mediana de leucócitos	$9,3 \times 10^9/L$	$5,4 \times 10^9/L$	$< 0,001$
Contagem mediana de plaquetas	$477,5 \times 10^9/L$	$141 \times 10^9/L$	$< 0,001$

V.3.2. Descrição dos pacientes com TVE e com a V617F-JAK2

As características clínico-laboratoriais dos pacientes com a V617F-JAK2 estão listadas na Tabela 10. Nesses pacientes, a quantificação alélica mostrou uma carga baixa do alelo mutado, não excedendo 50%, à exceção de um paciente com 84,9% (mediana 16,5%; 2–84,9%).

Tabela 10: Características dos 24 pacientes com a mutação V617F-JAK2

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Local da trombose	Fator V Leiden e PT G20210A	Fatores protrombóticos adquiridos	NMP	Carga alélica mutada (%)
1	M	41	SBC	PT G20210A	Esplenectomia	ND [§]	2,8
2	F	74	TP	Ausente	Ausente	PV prévia	44,2
3	F	28	SBC	Ausente	Ausente	PV durante investigação	16,4
4	F	23	TP	Ausente	Esplenectomia/CO	ND	15,8
5	F	24	SBC	Ausente	CO	PV durante investigação	26,2
6	M	42	SBC	Ausente	Ausente	PV durante investigação	9,6
7	F	56	TP	Ausente	Ausente	ND [§]	3,0
8	F	64	TP	Ausente	Ausente	ND	17,1
9	F	22	SBC	Ausente	Ausente	ND	5,0
10	M	63	TP	Ausente	Ausente	TE durante investigação	22,3
11	M	50	TP	Ausente	SAF	ND	16,8
12	M	50	SBC	NR	Ausente	PV prévia	84,9
13	M	43	TP	Ausente	Ausente	Fase pré-fibrótica de MP após detecção da V617F-JAK2	8,6
14	F	24	SBC	Ausente	CO	TE durante investigação	NA
15	M	42	TP	Ausente	Esquistossomose	ND	16,5
16	F	58	TP	Ausente	Esquistossomose	ND	20,7
17	M	27	TP	Ausente	Ausente	Ausente	6,2
18	F	43	TP	Ausente	CO	TE prévia	2,6
19	F	47	TP	Ausente	Ausente	TE após 12 meses de seguimento	18,1
20	F	48	TP	Ausente	CO	Ausente	2,0
21	F	45	TP	Ausente	Hepatite B	MP após 8 anos de seguimento	21,4
22	F	28	TP	Ausente	Trauma abdominal /CO	ND	4,3
Pacientes cirróticos							
1	F	34	TP	Ausente	Ausente	TE prévia	18,3
2	F	36	SBC	Ausente	Ausente	TE após 5 anos de seguimento	21,4

CO, contraceptivo oral; MP, mielofibrose primária; NMP, neoplasia mieloproliferativa; PT, protrombina; PV, policitemia vera; SAF, síndrome do anticorpo antifosfolípide; SBC, síndrome de Budd-Chiari; TE, trombocitemia essencial; TP, trombose porta.

NA: não avaliável. ND: aspirado/biópsia de medula óssea não disponível. NR: não realizado.

[§] Pacientes sem sinais sugestivos de NMP.

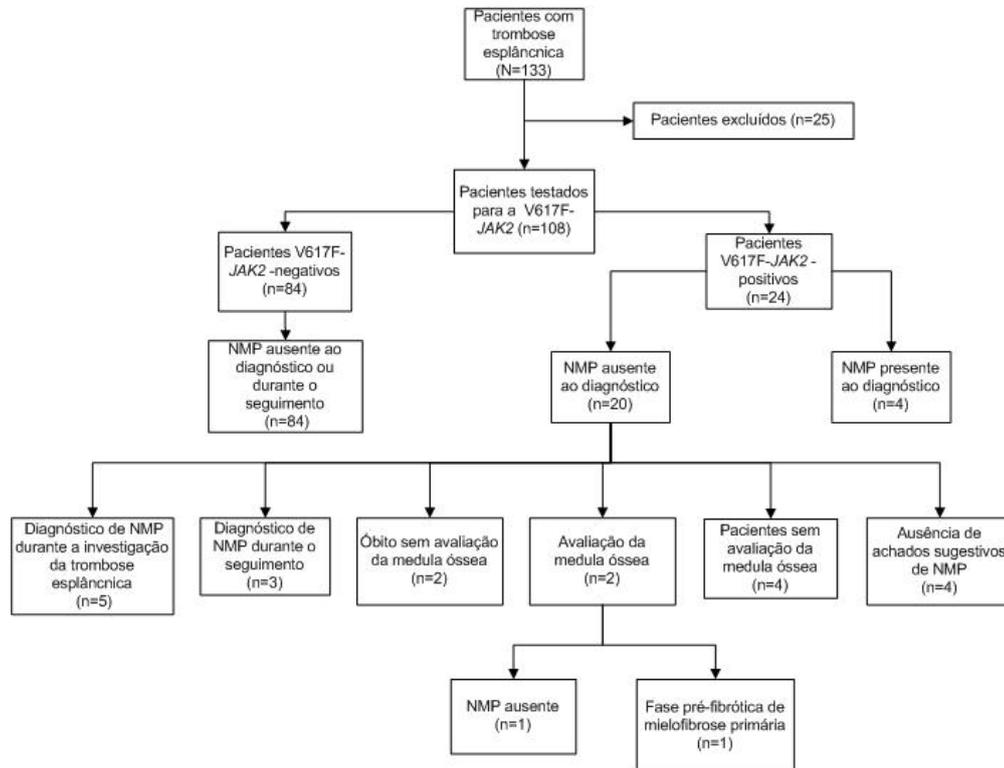
A mutação V617F-JAK2 foi detectada nos quatro pacientes com diagnóstico prévio de NMP (dois com PV e dois com TE) e cinco pacientes tiveram o diagnóstico de NMP durante a investigação da trombose esplâncnica (PV em três e TE em dois). Quatro outros pacientes foram diagnosticados com NMP (dois com TE e um com MP) após um seguimento mediano de 51 meses (1–104 meses). Nenhum dos pacientes V617F-JAK2-negativos desenvolveu evidências de NMP durante o seguimento.

Entre os outros 12 pacientes positivos que não preencheram critérios para o diagnóstico de NMP, oito apresentaram leucocitose, trombocitose e/ou esplenomegalia. Um deles faleceu, três meses após o diagnóstico de SBC, por insuficiência hepática (n. 9, Tabela 10). Outro paciente faleceu 11 anos após a TP, após complicações de um quadro de pancreatite e nenhuma avaliação da medula foi realizada durante esse período (n.11, Tabela 10). Dentre os outros seis pacientes, somente dois aceitaram submeter-se à realização de uma BMO. Em um deles, nenhum sinal de hiperplasia ou fibrose foi observado (n.17, Tabela 10). No outro paciente a BMO mostrou hiperplasia de todas as linhagens, presença de megacariócitos maduros, de tamanho aumentado e discreta fibrose, sugerindo fase pré-fibrótica de uma MP (n.13, Tabela 10).

Os outros quatro pacientes V617F-JAK2-positivos, incluindo dois com esplenectomia prévia, não apresentaram qualquer evidência sugestiva de NMP. Curiosamente, um deles foi submetido a uma BMO, que mostrou hiperplasia discreta da série mielóide e moderada da série megacariocítica, discreta eosinofilia, além de distúrbios de topografia e maturação da série megacariocítica (n. 20, Tabela 10).

A Figura 10 mostra uma representação esquemática dos resultados dos pacientes com trombose esplâncnica incluídos no estudo.

Figura 10: Representação esquemática dos resultados dos pacientes com trombose esplâncnica



NMP, neoplasia mieloproliferativa.

Dentre os 20 pacientes com cirrose hepática no momento da trombose (nove homens e 11 mulheres; idade mediana de 40,5 anos; 19-70), dois (10%) apresentaram a V617F-JAK2. Um deles tinha um diagnóstico prévio de TE e o outro teve o diagnóstico de TE cinco anos após o episódio trombótico. Os dados clínicos e laboratoriais desses dois pacientes cirróticos com a mutação também estão detalhados na Tabela 10.

VI. Discussão

A trombose é um fenômeno complexo, em que fatores de risco genéticos e adquiridos interagem dinamicamente.^{182,183} Nos pacientes com NMPs, as trombozes representam a maior causa de morbidade e mortalidade.¹⁸⁴

A mutação V617F-JAK2 foi recentemente identificada como um evento patogénico crucial, bem como uma ferramenta diagnóstica de grande utilidade nas NMPs.^{185,186} Alguns estudos iniciais sugeriram que os pacientes com NMPs V617F-JAK2-positivos apresentavam um risco ainda mais elevado de trombose.¹⁵³ Desde então, a associação entre a V617F-JAK2 e eventos trombóticos tem sido motivo de investigação.

V617F-JAK2 nos pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico

O AVEi resulta de mecanismos fisiopatológicos diversos, que envolvem a interação de fatores genéticos,¹⁸⁷ ambientais (como tabagismo, uso de anticoncepcionais orais, estresse) e comorbidades associadas (como *diabetes mellitus*, hipertensão e dislipidemia).¹⁸⁸ Nas neoplasias mieloproliferativas, os AVEis representam a principal manifestação trombótica.¹⁹

No presente estudo, a V617F-JAK2 foi detectada em 2 (1%) de 178 pacientes com AVEi, ambos considerados de etiologia indefinida após investigação completa. Quando analisado somente o grupo de pacientes com AVEi de etiologia indefinida após investigação completa, a prevalência da mutação aumentou para 2,8% (2/70). Um dos pacientes foi acompanhado por 5 e o outro por 10 anos, sem apresentarem sinais sugestivos de NMP. Após a detecção da V617F-JAK2, um deles apresentou discreta trombocitose ao hemograma e foi submetido a uma BMO, que mostrou alterações sugestivas de uma NMP subclínica. Estes resultados sugerem uma utilidade limitada da pesquisa da V617F-JAK2 nos pacientes com AVEi, mesmo considerando somente os casos idiopáticos.

Os resultados deste estudo são condizentes com os publicados na literatura. Até o momento, o papel da pesquisa da mutação V617F-JAK2 na investigação diagnóstica de uma NMP latente em pacientes com AVEi foi avaliado em apenas três estudos. Nenhum paciente apresentou a mutação nas séries estudadas por Smalberg e cols. (n=62) e Abel e cols. (n=10).^{167,169} Já Pardanani e cols. estudaram 137 pacientes com AVEi e detectaram a V617F-JAK2 em dois deles, um dos quais teve o diagnóstico de uma NMP inclassificável após prosseguimento da investigação.¹⁸⁹

Além de pacientes com AVEi, a frequência da V617F-JAK2 foi avaliada em pacientes com trombose arterial de outras localizações, bem como em pacientes com trombose venosa profunda (TVP) de membros inferiores, tromboembolismo pulmonar (TEP) e trombose venosa retiniana (TVR).^{157-159,164-170} Nesses pacientes, a prevalência da mutação foi baixa ou nula, não recomendando o seu uso nas trombozes venosas ou arteriais em geral.¹⁵

Recentemente foi publicada uma revisão dos estudos que avaliaram o papel da V617F-JAK2 em pacientes com trombose arterial (AVEi, IAM, trombose arterial periférica e trombose mesentérica). Os resultados sugeriram que a prevalência da V617F-JAK é baixa nesses pacientes e que a mutação não está associada à trombose arterial em pacientes sem evidências de NMP.¹⁹⁰

Sete estudos analisaram pacientes com trombozes venosas não-esplâncnicas e a prevalência da V617F-JAK2 não excedeu 1,5%.^{157-159,164,166,168,170} Além disso, todos os pacientes V617F-JAK2-positivos identificados (n=14) tinham mais de 50 anos. Um aspecto observado por um dos estudos, em que a prevalência da V617F-JAK2 foi 1% (2/194), foi que essa prevalência praticamente dobrou (1,9%) e mais que triplicou (3,4%) quando analisados somente pacientes com mais de 50 e 60 anos, respectivamente.¹⁷⁰ Com base nessa observação, os autores especulam que a triagem rotineira para a V617F-JAK2 talvez se justifique em pacientes idosos com trombozes venosas não-esplâncnicas.¹⁷⁰

V617F-JAK2 em pacientes com trombose venosa cerebral

No presente estudo, a mutação V617F-JAK2 não foi detectada nos 44 pacientes com TVC sem evidência clínico-laboratorial de NMP, sugerindo papel limitado da pesquisa da mutação nesse contexto. Alguns estudos prévios também observaram ausência ou baixa prevalência da V617F-JAK2 em pacientes com TVC sem NMP: De Stefano e cols. detectaram a mutação em 3 (6,2%) de 48 pacientes com TVC;¹⁶¹ Bellucci e cols. em 1 (1,1%) de 87;¹⁶⁰ Pardanani e cols. em 1 (14%) de 7 pacientes;¹⁶⁶ e os grupos de Rossi e Collaizzo não detectaram a V617F-JAK2 entre 13 e 45 pacientes, respectivamente.^{158,159}

Entretanto, não há um consenso sobre a indicação da triagem para a V617F-JAK2 nos pacientes com TVC e, considerando a raridade da doença, sua maior frequência nas NMPs e o pequeno número de pacientes incluídos nos estudos realizados até o momento, especula-se se a pesquisa rotineira da V617F-JAK2 se justificaria nesse contexto.^{140,161}

V617F-JAK2 nos pacientes com trombose venosa esplâncnica

A trombose da veia porta (TP) e a síndrome de Budd-Chiari (SBC) são condições raras e graves, frequentemente associadas a condições protrombóticas hereditárias ou adquiridas.¹⁹¹ Nos países desenvolvidos, as principais causas adquiridas são as NMPs e a cirrose hepática.^{133,192,193}

No presente estudo, todos os pacientes com TP e SBC encaminhados aos laboratórios de hemostasia para avaliação de risco trombótico foram incluídos, exceto aqueles com doenças neoplásicas abdominais. Os principais fatores protrombóticos observados foram cirrose hepática, uso de contraceptivo oral e NMPs. Sete pacientes haviam sido submetidos à esplenectomia e seis tinham história progressiva de esquistossomose mansônica. Em países subdesenvolvidos, onde a esquistossomose é endêmica, há relatos isolados de sua associação com

TP,¹⁹⁴ provavelmente relacionada a um aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, embora nenhum estudo sistemático a esse respeito tenha sido conduzido até o momento.

A mutação V617F-JAK2 foi detectada em 21% dos pacientes com TP e 26% dos pacientes com SBC. Estudos anteriores mostraram freqüências variáveis em outras séries de pacientes com TVEs: 17 a 36% em pacientes com TP e 40 a 58% na SBC.^{141,154,155,175,176} Considerando somente os pacientes sem NMP, a mutação foi detectada em 15/99 pacientes (15%). Na literatura, essa freqüência varia de 18 a 74%.^{141,154-157} Essas discrepâncias provavelmente se devem a critérios de inclusão variados, ao pequeno número de pacientes analisados na maior parte dos estudos, diferentes sensibilidades dos métodos usados para a detecção da mutação e diferentes tipos de amostras analisados.

Os pacientes com a V617F-JAK2 apresentaram contagem mediana de leucócitos e de plaquetas significativamente maior que os sem a mutação, achados condizentes com os dados publicados na literatura.^{155,176} Em relação à dosagem de hemoglobina, não houve diferença entre os dois grupos, achado semelhante ao observado em dois estudos,^{155,174} e divergente de outro.¹⁷⁶ É provável que o número de pacientes estudados tenha influenciado esses resultados.

Cabe ressaltar que, dentre os 24 pacientes V617F-JAK2-positivos, somente quatro tinham um diagnóstico prévio de NMP e cinco foram diagnosticados no momento da trombose. Durante o acompanhamento, três pacientes tiveram o diagnóstico de NMP e outro paciente teve o diagnóstico de MP (fase pré-fibrótica) após a detecção da V617F-JAK2, representando casos de NMP latente. Por outro lado, nenhum dos pacientes V617F-JAK2-negativos apresentou evidências sugestivas de NMP durante o acompanhamento. Esses achados demonstram a utilidade clínica da pesquisa da mutação V617F-JAK2 em pacientes com TVE e estão de acordo com os resultados de uma meta-análise publicada recentemente, em que o papel da V617F-JAK2 em pacientes com tromboembolismo venoso de

diversas localizações foi avaliado.¹⁴ As conclusões da meta-análise indicam que a V617F-JAK2 tem associação significativa com TVE e é um forte preditor do diagnóstico subsequente de NMP, justificando sua pesquisa rotineira nesse contexto.

Embora poucos pacientes tenham sido submetidos a uma BMO, os achados do presente estudo evidenciam e reforçam a importância da avaliação histológica da MO, não só nos pacientes V617F-JAK2-positivos para a confirmação e classificação da NMP, mas também nos pacientes sem a mutação, devido à possibilidade de casos V617F-JAK2-negativos, especialmente TE e MP.

Neste estudo, outro aspecto a ser lembrado é que a pesquisa de outras mutações do gene JAK2 e do MPL não foi realizada, o que poderia aumentar o número de pacientes com NMP latente. Poucos estudos até o momento avaliaram a frequência de outros marcadores moleculares em pacientes com TVE: Kiladjian e cols. não encontraram mutações do JAK2 nem do MPL em 147 pacientes V617F-JAK2-negativos,¹⁷⁶ resultado semelhante ao observado por Fiorini e cols.¹⁹⁵ Por outro lado, Collaizzo e cols. detectaram uma mutação do gene JAK2 em um paciente com SBC e em outro com TP, sugerindo um possível papel para sua pesquisa nos pacientes sem a V617F-JAK2.¹⁹⁶

No presente estudo, a V617F-JAK2 foi encontrada em frequência semelhante em pacientes com e sem fatores de risco protrombóticos (17/68 – 25% vs. 7/40 – 18%). Resultados semelhantes foram observados por outros grupos que analisaram tal correlação.^{155,174,176,197} Não se pode deixar de ressaltar que o grupo de pacientes aqui analisados provavelmente apresenta menor frequência de fatores de risco protrombóticos adquiridos, considerando que foram encaminhados a laboratórios de referência para a pesquisa de trombofilia. De qualquer forma, esses achados apontam para a importância de uma investigação clínica e laboratorial completa, mandatória em todos os pacientes, mesmo quando um fator de risco for identificado.

Nos pacientes com cirrose hepática, habitualmente não se procede à avaliação etiológica da trombose esplâncnica, pela associação causal já reconhecida entre as duas situações. Até o momento, a presença da V617F-JAK2 em pacientes cirróticos foi avaliada somente em dois estudos, com resultado negativo em ambos.^{172,174} No presente estudo, no entanto, a V617F-JAK2 foi detectada em 2 (10%) dos 20 pacientes cirróticos. Um deles tinha um diagnóstico prévio de TE, enquanto o outro teve um diagnóstico de TE cinco anos após o episódio trombótico.

Papel da carga alélica mutada

Nos pacientes com NMPs, a carga de alelo com a mutação V617F-JAK2 parece favorecer um fenótipo policitêmico, bem como uma evolução clínica mais sintomática.^{2,91,198} Neste estudo, 22/23 pacientes V617F-JAK2-positivos avaliáveis apresentaram uma carga alélica mutada baixa (mediana de 16,5%), não excedendo 50%, sugerindo que a maioria, senão todos, eram heterozigotos. Somente um paciente V617F-JAK2-positivo, com diagnóstico de PV prévio ao episódio trombótico, apresentou 84% de alelo mutado, sugerindo homozigose. Nos estudos publicados, achados similares foram observados em relação à carga alélica da V617F-JAK2 em pacientes com TVE.^{155,156,159,176} Kiladjian e cols. sugeriram que os níveis baixos de alelo mutado detectados na maioria desses pacientes poderia ser um dos motivos para a baixa taxa de evolução de formas de NMPs latentes para quadros clinicamente manifestos.¹⁷⁶

Um aspecto a ser considerado é o tipo de célula usada para a determinação da carga alélica da V617F-JAK2. Até o momento, não há consenso sobre qual é a melhor amostra biológica (sangue total, granulócitos, plaquetas, células mononucleares ou células da medula óssea) para essa análise.^{58,199} Cabe ressaltar que a diluição com número considerável de células que exibem a sequência selvagem (principalmente linfócitos) pode levar a resultados falso-negativos, bem como subestimar a quantificação de alelo mutado. No presente estudo, o DNA

usado para análise foi extraído de leucócitos de sangue total. Portanto, a quantificação alélica pode ter sido subestimada, se comparada a uma quantificação realizada em amostras de granulócitos purificados dos mesmos pacientes. Todavia, considerando que entre os pacientes com menos de 50% de alelo mutado (n=22), somente dois apresentaram carga alélica maior que 25%, possivelmente uma análise comparativa desses resultados usando granulócitos mostraria um cenário muito similar.

Outro aspecto a ser considerado se refere à sensibilidade analítica do método utilizado. Neste estudo, as sensibilidades analíticas do método de triagem (1%) e do método quantitativo (2%) foram consistentes com relatos anteriores.^{5,200} O significado da detecção de níveis muito baixos (<1%) de alelo mutado ainda não está estabelecido,⁸¹ mas poderá ser útil no acompanhamento de pacientes em uso de tratamento quimioterápico convencional²⁰¹ ou inibidores específicos para a V617F-JAK2. Adicionalmente, a quantificação alélica poderá ser útil no acompanhamento de pacientes com carga alélica baixa e sem manifestações de NMP, hipótese que precisa de uma validação prospectiva.

Mecanismos protrombóticos nas neoplasias mieloproliferativas

Vários mecanismos foram propostos para explicar o estado de hipercoagulação adquirido observado nos pacientes com NMP, incluindo anormalidades eritrocitárias, plaquetárias e leucocitose.¹⁹ Entretanto, as razões para a maior frequência de trombozes esplâncnicas nas NMPs ainda não estão estabelecidas. Algumas hipóteses levantadas são o aumento do fluxo portal, a esplenomegalia e a hematopoiese extramedular hepática.¹¹⁸ Boissinot e cols. observaram uma maior expressão total de JAK2 (selvagem + V617F) em pacientes com TVE, o que poderia desempenhar um papel causal nesse contexto, independente da doença associada à TVE.¹⁷² Em um estudo recente de Sozer e cols., foi demonstrada homozigose para a V617F-JAK2 nas células endoteliais das

vênulas hepáticas de dois pacientes com SBC e PV. Os autores especulam que, pelo menos em uma subpopulação de pacientes, a NMP poderia se originar de uma célula precursora comum para as células hematopoiéticas e endoteliais.²⁰²

Limitações do estudo

Devido à natureza retrospectiva deste estudo, duas principais limitações não puderam ser evitadas: a indisponibilidade de alguns dados, particularmente no que se refere às biópsias de medula óssea e às biópsias hepáticas para exclusão do diagnóstico de cirrose hepática; e um viés de seleção, já que os pacientes estudados foram encaminhados a laboratórios de hemostasia e representam, dessa forma, um grupo específico, cujos resultados talvez não se apliquem a pacientes com TVE não-selecionados.

Além disso, por se tratar de um estudo retrospectivo de três grupos de pacientes distintos (AVEi, TVC e TVE) e com alguns dados indisponíveis, optou-se por não fazer a análise dos fatores de risco protrombóticos em todos os pacientes. Devido à ausência da mutação nos pacientes com TVC e à baixa frequência nos pacientes com AVEi, a análise dos fatores de risco foi feita somente no grupo de TVE, com o intuito de avaliar a frequência de fatores de risco protrombóticos nos pacientes com ou sem a mutação.

Considerações finais

Embora seja considerada apenas o início de um longo caminho a ser percorrido para desvendar a genética das NMPs, a descoberta da V617F-JAK2 transformou a abordagem diagnóstica dessas entidades.

Não está claro, até o momento, se a presença da mutação V617F-JAK2 modifica o risco trombótico em pacientes com NMP, embora as evidências clínicas apontem nessa direção. Além disso, permanece em aberto se a V617F-JAK2 está independentemente associada a eventos trombóticos, fora do contexto das NMPs.¹⁵³

Apesar das limitações impostas pela natureza retrospectiva deste estudo, os resultados sugerem que a V617F-JAK2 é freqüente em pacientes com TVE, incluindo pacientes cirróticos, justificando sua pesquisa rotineira. A identificação de uma NMP tem grande relevância clínica nesse cenário, já que a história de um evento trombótico prévio é um dos principais fatores de risco para um novo episódio de trombose nos pacientes com NMP.¹⁹ Ademais, apresenta implicações terapêuticas, já que o manejo das NMPs permanece altamente dependente do risco trombótico de cada paciente.⁵⁷ Estudos prospectivos cuidadosamente planejados são necessários para melhor elucidar o papel da V617F-JAK2 e da carga de alelo mutado no diagnóstico e manejo adequados dos pacientes com trombozes esplâncnicas, incluindo os cirróticos.

Com as mesmas limitações, os resultados deste estudo sugerem pouca utilidade para a pesquisa da mutação em pacientes com TVC ou com AVEi. Entretanto, considerando a alta prevalência, morbidade e mortalidade do AVEi, estudos prospectivos e com maior número de pacientes são necessários para elucidar a relevância clínica da identificação da V617F-JAK2 nesse grupo, especialmente à luz do progresso substancial na pesquisa para o desenvolvimento de inibidores específicos para a mutação.²⁰³

Um último ponto a ser considerado se refere à identificação de pacientes V617F-JAK2-positivos, sem qualquer outra alteração clínico-laboratorial sugestiva de NMP. No momento, não há recomendação para intervenção nesses casos, somente para o acompanhamento do paciente, pela possibilidade do desenvolvimento posterior de uma NMP.

VII. Conclusões

1. Os dados colhidos sugerem que a mutação V617F-JAK2 é rara em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico sem evidências clínico-laboratoriais de neoplasia mieloproliferativa.
2. Os dados colhidos sugerem que a mutação V617F-JAK2 é rara em pacientes com trombose venosa cerebral sem evidências clínico-laboratoriais de neoplasia mieloproliferativa.
3. Os dados colhidos sugerem que a mutação V617F-JAK2 é frequente em pacientes com trombose venosa esplâncnica, incluindo pacientes cirróticos, na presença ou ausência de evidências clínico-laboratoriais de neoplasia mieloproliferativa.
4. A frequência da V617F-JAK2 nos pacientes com trombose venosa esplâncnica com e sem fatores de risco protrombóticos foi semelhante, sugerindo a importância de uma investigação clínica e laboratorial completa em todos os pacientes, mesmo quando um fator de risco for identificado.
5. Apesar das várias limitações metodológicas, este estudo sugere que a pesquisa da V617F-JAK2 seja incluída na rotina diagnóstica de pacientes com trombose venosa esplâncnica.
6. Com as mesmas limitações, este estudo sugere que a pesquisa da V617F-JAK2 não se justifica na rotina diagnóstica de pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico ou trombose venosa cerebral.

VIII. Referências bibliográficas

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A *et al.* The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 Apr 8. *Epub ahead of print.*
2. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Eng J Med* 2006;355:2452-66.
3. WHO classification of the chronic myeloproliferative diseases (CMPD). In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization Classification of Tumours, vol. 3. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001:15-44.
4. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-56.
5. 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.
6. James C, Ugo V, Le-Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144-8.
7. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and agnogenic myeloid metaplasia. *Cancer Cell* 2005;7:387-97.
8. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR *et al.* A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-90.

-
9. Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2^{V617F}: When to order the tests and how to interpret the results. *Leuk Res* 2006;30:739-44.
 10. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C *et al*. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol* 2005;23:2224-32.
 11. Bazzan M, Tamponi G, Schinco P, Vaccarino A, Foli C, Gallone G *et al*. Thrombosis-free survival and life expectancy in 187 consecutive patients with essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 1999;78:539-43.
 12. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT *et al*. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366:1945-53.
 13. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. *Haematologica* 2007;92:135-6.
 14. Dentali F, Squizzato A, Brivio L, Appio L, Campiotti L, Crowther M *et al*. JAK2V617F mutation for the early diagnosis of Ph⁻ myeloproliferative neoplasms in patients with venous thromboembolism: a meta-analysis. *Blood* 2009;113:5617-23.
 15. Mannucci PM, Peyvandi F. Thrombophilia screening: little role for the JAK2V617F mutation. *Mayo Clin Proc* 2008;83:398-9.
 16. Dentali F, Squizzato A, Appio L, Brivio L, Ageno W. JAK2V617F mutation in patients with arterial thrombosis in the absence of overt myeloproliferative disease. *J Thromb Haemost* 2009;7:722-5.
 17. Barbui T, Finazzi G. Evidence-based management of polycythemia vera. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:483-93.

-
18. Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Pathogenetic mechanisms and prevention. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:617-33.
 19. Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia* 2008;22:2020-8.
 20. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6:372-5.
 21. Hamerschlak N. Policitemia Vera. Em: Zago MA, Falcão RP e Pasquini R, editores. Hematologia: Fundamentos e Prática. 1^a ed. São Paulo, Atheneu 2001, p.351-6.
 22. Tabak D. Trombocitemia Essencial. Em: Zago MA, Falcão RP e Pasquini R, editores. Hematologia: Fundamentos e Prática. 1^a ed. São Paulo, Atheneu 2001, p.557-65.
 23. Dougan LE, Matthews MLV, Armstrong BK. The effect of diagnostic review on the estimated incidence of lymphatic and hematopoietic neoplasms in Western Australia. *Cancer* 1981;48:866-72.
 24. Chaitey Y, Brenner B, Aghai E, Tatarsky I. High incidence of myeloproliferative disorders in Ashkenazi Jews in northern Israel. *Leuk Lymphoma* 1992;7:251-5.
 25. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County study, 1976-1995. *Am J Hematol* 1999;61:10-15.
 26. Johansson P, Kutti J, Andréasson B, Safai-Kutti S, Vilén L, Wedel H *et al.* Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Göteborg, Sweden, during 1983-99. *J Int Med* 2004;256:161-5.
 27. Kralovics R, Skoda RC. Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Rev* 2005;19:1-13.

-
28. Mertens F, Johansson B, Heim S, Kristoffersson U, Mitelman F. Karyotypic patterns in chronic myeloproliferative disorders: report on 74 cases and review of the literature. *Leukemia* 1991;5:214-20.
 29. Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, Holden JL, French L, Swanton S *et al.* Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. *Oncogene* 2000;19:3902–13.
 30. Harrison CN. Platelets and thrombosis in myeloproliferative disease. *Hematology* (Am Soc Hematol Educ Program) 2005:409-15.
 31. Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R *et al.* Chronic Myeloproliferative Disorders. *Hematology* (Am Soc Hematol Educ Program) 2003:200-24.
 32. Nelson ME, Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: What do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 2006;47:177-94.
 33. Prchal JF, Axelrad AA. Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* 1974;290:1382.
 34. Casadevall N, Vainchenker W, Lacombe C, Vinci G, Chapman J, Breton-Gorius J *et al.* Erythroid progenitors in polycythemia vera: demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum-free cultures. *Blood* 1982;59:447–51.
 35. Li Y, Hetet G, Maurer A-M, Chait Y, Dhermy D, Briere J. Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL3, IL6 and GM-CSF. *Br J Haematol* 1994;87:471–6.
 36. Kobayashi S, Teramura M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H. Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3. *Br J Haematol* 1993;83:539–44.

-
37. 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.
 38. Hinshelwood S, Bench AJ, Green AR. Pathogenesis of polycythaemia vera. *Blood Rev* 1997;11:224–32.
 39. Reilly JT. Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. *Blood Rev* 2003;17:241-8.
 40. Wadleigh M, DeAngelo DJ, Griffin JD, Stone RM. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. *Blood* 2005;105:22-30.
 41. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J *et al.* A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *New Engl J Med* 2003;348:1201-14.
 42. Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol* 2004;11:58-64.
 43. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE III, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 2004;5:253.
 44. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002;298:1912-34.
 45. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007;282:20059-63.
 46. Chen M, Cheng A, Chen Y, Hymel A, Hanson EP, Kimmel L *et al.* The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common γ chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6910-15.

-
47. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001;8:1327-38.
 48. Zhou Y-J, Chen M, Cusack NA, Kimmel LH, Magnuson KS, Boyd JG *et al.* Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implications for Janus kinases. *Mol Cell* 2001;8:959-69.
 49. Leonard WJ, O'Shea JJ. JAKs and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293-322.
 50. Ihle JN. Cytokine receptor signaling. *Nature* 1995;377:591-4.
 51. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285:1-24.
 52. Levy DE, Darnell Jr JE. STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651-62.
 53. Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 2002;296:1653-5.
 54. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN *et al.* Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 1993;74:237-44.
 55. Campbell GS, Argetsinger LS, Ihle JN, Kelly PA, Rillema JA, Carter-Su C. Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5232-6.
 56. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine J-C, Teglund S *et al.* Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998;93:385-95.

-
57. Tefferi A. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology* (Am Soc Hematol Educ Program) 2006;240-5.
58. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7:673-83.
59. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL *et al*. The JAK2V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005;106:1207-9.
60. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS *et al*. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 2006;108:2173-81.
61. Lee JW, Kim YG, Soung YH, Han KJ, Kim SY, Rhim HS *et al*. The JAK2 V617F mutation in *de novo* acute myelogenous leukemias. *Oncogene* 2006;25:1434-6.
62. Gattermann N, Billiet J, Kronenwett R, Zipperer E, Germing U, Nollet F *et al*. High frequency of the JAK2V617F mutation in patients with thrombocytosis (platelet count > 600 x 10⁹/L) and ringed sideroblasts more than 15% considered as MDS/MPD, unclassifiable. *Blood* 2007;109:1334-5.
63. Schmitt-Graeff AH, Teo S-S, Olschewski M, Schaub F, Haxelmans S, Kirn A *et al*. JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 2008;93:34-40.
64. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Lee JY *et al*. JAK2 V617F mutation is uncommon in non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2006;47:313-4.

-
65. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJP, Loh ML, Beran M, Stoffregen E *et al.* The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106:3377-9.
66. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Lee JY *et al.* Absence of JAK2 V617F mutation in gastric cancers. *Acta Oncol* 2006;45:222-3.
67. Jones AV, Kreil S, 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.
68. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li C-Y, Dingli D *et al.* Concomitant neutrophil JAK2^{V617F} mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol* 2005;131:166-71.
69. Büsche G, Hussein K, Bock O, Kreipe H. Insights into JAK2-V617F mutation in CML. *Lancet Oncol* 2007;8:863-4.
70. Bocchia M, Vannucchi AM, Gozzetti A, Guglielmelli P, Poli G, Crupi R *et al.* Insights into JAK2-V617F mutation in CML. *Lancet Oncol* 2007;8:864-6.
71. Xu X, Zhang Q, Luo J, Xing S, Li Q, Krantz SB *et al.* JAK2V617F: prevalence in large Chinese hospital population. *Blood* 2007;109:339-42.
72. Sidon P, Heimann P, Lambert F, Dessars B, Robin V, El Housni H. Combined locked nucleic acid and molecular beacon technologies for sensitive detection of the JAK2V617F single-base sequence variant. *Clin Chem* 2006;52:1436-8.
73. Sidon P, El Housni H, Dessars B, Heimann P. The JAK2V617F mutation is detected at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia* 2006;20:1622.
74. Verstovsek S, Silver RT, Cross NCP, Tefferi A. JAK2V617F mutation frequency in polycythemia: 100%, 90%, less? *Leukemia* 2006;20:2067.

-
75. Jones AV, Silver RT, Waghorn K, Curtis C, Kreil S, Zoi K *et al.* Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or interferon alpha. *Blood* 2006;107:3339-41.
76. Kiladjian J-J, Cassinat B, Turlure P, Cambier M, Roussel N, Bellucci S *et al.* High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon a-2a. *Blood* 2006;108:2037-40.
77. Spanoudakis E, Bazdiara I, Kotsianidis I, Margaritis D, Goutzouvelidis, Christoforidou A *et al.* Hydroxyurea (HU) is effective in reducing JAK2V617F mutated clone size in the peripheral blood of essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV) patients. *Ann Hematol* 2009;88:629-32.
78. Campbell PJ, Scott LM, Baxter EJ, Bench AJ, Green AR, Erber WN. Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders. In: Iland H, Hertzberg M, Marlton P, eds. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 125. *Myeloid Leukemia: Methods and Protocols*. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc.; 2006:253-64.
79. McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006;20:168-71.
80. Smith CA, Fan G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol* 2008;39:795-810.
81. Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *J Mol Diagn* 2006;8:397-411.
82. Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 2002;19:479-85.
83. Pardanani A, Hood J, Lasho T, Levine RL, Martin MB, Noronha G *et al.* TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits

myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia* 2007;21:1658-68.

84. Lasho TL, Tefferi A, Hood JD, Verstovsek S, Gilliland DG, Pardanani A. TG101348, a JAK2-selective antagonist, inhibits primary hematopoietic cells derived from myeloproliferative disorder patients with JAK2V617F, MPLW515K or JAK2 exon 12 mutations as well as mutation negative patients. *Leukemia* 2008;22:1790-2.
85. Lipka DB, Hoffmann LS, Heidel F, Markova B, Blum MC, Breitenbuecher F *et al.* LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1176-84.
86. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP *et al.* Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* 2007;109:2279-84.
87. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V *et al.* Clinical implications of the JAK2V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005;19:1847-9.
88. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ *et al.* JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005;131:208-13.
89. Dahabreh IJ, Zoi K, Giannouli S, Zoi C, Loukopolos D, Voulgarelis M. Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res* 2009;33:67-73.
90. Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K, Dohner H, Kusec R, Hasselbach HC *et al.* V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006;107:2098-100.
91. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E *et al.* JAK2 V617F mutational status predicts progression to large

-
- splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007;110:4030-6.
92. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY *et al.* The JAK2^{V617F} tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol* 2005;131:320-8.
93. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Hanson CA, Mesa RA *et al.* Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, predicts inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 2008;22:756-61.
94. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J *et al.* Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type JAK2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008;111:3931-40.
95. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V *et al.* The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006;108:1865-7.
96. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G *et al.* Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008;93:41-8.
97. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R *et al.* The clinical phenotype of wild-type, heterozygous and homozygous JAK2^{V617F} in polycythemia vera. *Cancer* 2006;106:631-5.
98. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V *et al.* Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2^{V617F} allele burden. *Leukemia* 2007;21:1952-9.
99. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R *et al.* Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007;110:840-6.

-
100. Mesa RA, Powell H, Lasho T, DeWald GW, McClure R, Tefferi A. A longitudinal study of the JAK2^{V617F} mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: analysis at two time points. *Haematologica* 2006;91:415-6.
 101. Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemia. *Semin Hematol* 1975;12:339-51.
 102. Murphy S, Peterson P, Iland H. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with the essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival and leukemia transition by treatment. *Semin Hematol* 1997;34:29-39.
 103. Pearson TC, Messinezy M. The diagnostic criteria of polycythaemia rubra vera. *Leuk Lymphoma* 1996;22 Suppl 1:87-93.
 104. Tefferi A, Vardiman JW. Diagnostic interface between histology and molecular tests in myeloproliferative disorders. *Curr Opin Hematol* 2007;14:115-22.
 105. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA *et al.* Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007;110:1092-7.
 106. Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005;105:4187-90.
 107. Kilpivaara O, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia* 2008;22:1813-7.
 108. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356:459-68.
 109. Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. Phenotypic variations and new mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol* 2007;35:1641-6.

-
110. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocarides A *et al.* Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2^{V617F}-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:1686-9.
111. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M *et al.* MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270.
112. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M *et al.* MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472-6.
113. Beer PA, Campbell P, Erber WN, Scott LM, Bench AJ, Bareford D *et al.* Clinical significance of MPL mutation in essential thrombocythemia: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2007;110:677.
114. Vannucchi AM, Guglielmelli P. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations. *Haematologica* 2008;93:972-6.
115. Tefferi A, Levine RL, Kantarjian H. Oncogenic signals as treatment targets in classic myeloproliferative neoplasms. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:114-9.
116. Harrison CN, Green AR. Essential thrombocythaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:439-53.
117. Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995;123:656-64.
118. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2004;128:275-90.
119. Kistler JP, Ropper AH, Martin JB. Cerebrovascular diseases. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fanci AS, Kasper DL, eds. Harrison's

-
- principles of internal medicine. 13th ed. New York, USA: McGraw-Hill; 1995:2233-56.
120. Bousser MG. Antithrombotic strategy in stroke. *Thromb Haemost* 2001;8:1-7.
121. Adams Jr. HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL *et al*. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in acute stroke treatment. *Stroke* 1993;24:35-41.
122. Schafer AL, Kroll MH. Non-atheromatous arterial thrombosis. *Annu Rev Med* 1993;44:155-70.
123. Scheffer MG, Michiels JJ, Simoons ML, Roeland JRTC. Thrombocythaemia and coronary artery disease. *Am Heart J* 1991;122:573-6.
124. Stam J. Thrombosis of the cerebral and sinuses. *N Engl J Med* 2005;352:1791-8.
125. Bousser MG, Ferro JM. Cerebral venous thrombosis: an update. *Lancet Neurol* 2007;6:162-70.
126. Ferro JM, Canhão P, Stam J, Bousser MG, Barinagarrementeria F. Prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis: results of the International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT). *Stroke* 2004;35:664-70.
127. Brière JB. Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis associated with myeloproliferative disorders: diagnosis and management. *Semin Thromb Haemost* 2006;32:208-18.
128. Wang JT, Zhao HY, Liu YL. Portal vein thrombosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005;4:515-8.
129. Valla DC. Budd-Chiari syndrome and veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome. *Gut* 2008;57:1469-78.
130. Valla DC. Primary Budd-Chiari syndrome. *J Hepatol* 2009;1:195-203.

-
131. Anger BR, Seifried E, Scheppach J, Heimpel H. Budd-Chiari syndrome and thrombosis of other abdominal vessels in the chronic myeloproliferative diseases. *Klin Wochenschr* 1989; 67:818-25.
132. Lengfelder E, Hochhaus A, Kronawitter U, Hoche D, Queisser W, Jahn-Eder M *et al.* Should a platelet limit of $600 \times 10^9/L$ be used as a diagnostic criterion in essential thrombocythaemia? An analysis of the natural course including early stages. *Br J Haematol* 1998;100:15-23.
133. Denninger MH, Chait Y, Casadevall N, Hillaire S, Guillin MC, Bezeaud A *et al.* Cause of portal or hepatic venous thrombosis in adults: the role of multiple concurrent factors. *Hepatology* 2000;31:587-91.
134. Janssen HLA, Meinardi JR, Vleggaar FP, van Uum SHM, Haagsma EB, van der Meer FJM *et al.* Factor V Leiden mutation, prothrombin gene mutation, and deficiencies in coagulation inhibitors associated with Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: results of a case-control study. *Blood* 2000;96:2364-8.
135. Valla D. Hepatic vein thrombosis (Budd-Chiari Syndrome). *Semin Liver Dis* 2002; 22:5-14.
136. Primignani M, Martinelli I, Bucciarelli P, Battaglioli T, Reati R, Fabris F *et al.* Risk factors for thrombophilia in extrahepatic portal vein obstruction. *Hepatology* 2005;41:603-8.
137. Chait Y, Condat B, Cazals-Hatem D, Rufat P, Atmani S, Chaoui D *et al.* Relevance of the criteria commonly used to diagnose myeloproliferative disorder in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol* 2005;129:553-60.
138. Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood* 2002;100:4272-90.
139. Thurmes PJ, Steensma DP. Elevated serum erythropoietin levels in patients with Budd-Chiari syndrome secondary to polycythemia vera: clinical

-
- implications for the role of JAK2 mutation analysis. *Eur J Haematol* 2006;77:57-60.
140. Hexner EO. JAK2 V617F: implications for thrombosis in myeloproliferative diseases. *Curr Opin Hematol* 2007;14:450-4.
141. Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, Westwood NB, Milojkovic D, Thanigaikumar M *et al*. Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 2006;130:2031-8.
142. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D *et al*. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica* 2008;93:1645-51.
143. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R *et al*. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;109:2446-52.
144. Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V *et al*. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2008;26:2732-6.
145. Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Sole F, Hernandez-Boluda JC *et al*. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 1999;13:150-4.
146. Jantunen R, Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Anttila P, Ruutu T. The predictive value of vascular risk factors and gender for the development of thrombotic complications in essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 2001;80:74-8.
147. Jensen MK, de Nully Brown P, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in well defined geographical area. *Eur J Haematol* 2000;65:132-9.

-
148. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 2006;81:159-66.
149. Ruggeri M, Gisslinger H, Tosetto A, Rintelen C, Mannhalter C, Pabinger I *et al.* Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2002;71:1-6.
150. Gisslinger H, Rodeghiero F, Ruggeri M, Heis-Vahidi Fard N, Mannhalter C, Papagiannopoulos M *et al.* Homocysteine levels in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1999;105:551-5.
151. Faurschou M, Nielsen OJ, Jensen MK, Hasselbalch HC. High prevalence of hyperhomocysteinemia due to marginal deficiency of cobalamin or folate in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 2000;65:136-40.
152. Amitrano L, Guardascione MA, Ames PR, Margaglione M, Antinolfi I, Iannaccone L *et al.* Thrombophilic genotypes, natural anticoagulants, and plasma homocysteine in myeloproliferative disorders: relationship with splanchnic vein thrombosis and arterial disease. *Am J Hematol* 2003;72:75-81.
153. Austin SK, Lambert JR. The JAK2V617F mutation and thrombosis. *Br J Haematol* 2008;143:307-20.
154. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, Za T, Farina G, Chiusolo P *et al.* Incidence of the JAK2V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost* 2007;5:708-14.
155. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, Gianelli U, Fabris F, Reati R *et al.* Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* 2006;44:1528-34.
156. Goulding C, Uttenthal B, Feroni L, Duke V, Traore A, Kottaridis P *et al.* The JAK2^{V617F} tyrosine kinase mutation identifies clinically latent myeloproliferative

-
- disorders in patients presenting with hepatic or portal vein thrombosis. *Int J Lab Haematol* 2008;30:415-9.
157. Regina S, Herault O, D'Alteroche L, Binet C, Gruel Y. JAK2 V617F is specifically associated with idiopathic splanchnic vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007;5:859-61.
158. Rossi D, Cresta S, Destro T, Vendramin C, Bocchetta S, De Paoli L *et al*. JAK2V617F in idiopathic venous thromboembolism occurring in the absence of inherited or acquired thrombophilia. *Br J Haematol* 2007;138:813-4.
159. Colaizzo D, Amitrano L, Iannaccone L, Vergura P, Cappucci F, Grandone E *et al*. Gain-of-function gene mutations and venous thromboembolism: distinct roles in different clinical settings. *J Med Genet* 2007;44:412-6.
160. Bellucci S, Cassinat B, Bonnin N, Marzac C, Crassard I. The V617F-JAK2 mutation is not a frequent event in patients with cerebral venous thrombosis without overt chronic myeloproliferative disorder. *Thromb Haemost* 2008;99:1119-20.
161. De Stefano V, Rossi E, Za T, Chiusolo P, Leone G. The JAK2V617F mutation in patients with cerebral venous thrombosis: A rebuttal. *Thromb Haemost* 2008;99:1121.
162. Pardanani A, Lasho TL, Schwager S, Finke C, Hussein K, Pruthi RK *et al*. JAK2V617F prevalence and allele burden in non-splanchnic venous thrombosis in the absence of overt myeloproliferative disorder. *Leukemia* 2007;21:1828-9.
163. Janssen HLA, Leebeek FWG. JAK2 mutation: the best diagnostic tool for myeloproliferative disease in splanchnic vein thrombosis? *Hepatology* 2006;44:1391-3.
164. Remacha AF, Estivill C, Sarda MP, Mateo J, Souto JC, Canals C *et al*. The V617F mutation of JAK2 is very uncommon in patients with thrombosis. *Haematologica* 2007;92:285-6.

-
165. Sène D, Elalamy I, Ancrì A, Cacoub P. JAK2V617F mutation is not associated with unexplained recurrent arterial and venous thrombosis. *Thromb Res* 2008;122:427-8.
166. Pardanani A, Lasho TL, Hussein K, Schwager SM, Finke CM, Pruthi RK *et al.* JAK2V617F mutation screening as part of the hypercoagulable work-up in the absence of splanchnic venous thrombosis or overt myeloproliferative neoplasm: assessment of value in a series of 664 consecutive patients. *Mayo Clin Proc* 2008;83:457-9.
167. Abel GA, DeAngelo DJ, Connors JM, Sholl LM, McCaffrey RP, Longtine JA. Clinical JAK2V617F mutation testing: limited utility for general hospital patients with venous and arterial thromboses in common locations. *Am J Hematol* 2008;83:519-20.
168. Ugo V, Le Gal G, Lecucq L, Mottier D, Oger E, for the EDITH Collaborative Study Group. Prevalence of the JAK2 V617F mutation is low among unselected patients with a first episode of unprovoked thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2008;6:203-5.
169. Smalberg JH, De Maat MPM, Leebeek FWG. Absence of the JAK2 V617F mutation in patients with arterial thrombosis without overt myeloproliferative disease. *J Thromb Haemost* 2008;6:1606-7.
170. Za T, Fiorini A, Rossi E, Ciminello A, Chiusolo P, Leone G. Prevalence of the JAK2 V617F mutation in patients with unprovoked venous thromboembolism of common sites and without overt myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 2009;144:965-7.
171. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V *et al.* V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* 2007;35:702-11.
172. Boissinot M, Lippert E, Girodon F, Dobo I, Fouassier M, Masliah C *et al.* Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation and

-
- endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis. *Blood* 2006;108:3223-4.
173. Smalberg JH, Murad SD, Braakman E, Valk PJ, Janssen HLA, Leebeek FWG. Myeloproliferative disease in the pathogenesis and survival of Budd-Chiari syndrome. *Haematologica* 2006;91:1712-3.
174. McMahon C, Abu-Elmagd K, Bontempo FA, Kant JA, Swerdlow SH. JAK2 V617F mutation in patients with catastrophic intra-abdominal thromboses. *Am J Clin Pathol* 2007;127:736-43.
175. Bayraktar Y, Harmanci O, Büyükasik Y, Shorbagi AI, Sungur AH, Boylu CA *et al.* JAK2V617F mutation in patients with portal vein thrombosis. *Dig Dis Sci* 2008;53:2778-83.
176. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FWG, Marzac C, Cassinat B, Chevret S *et al.* The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* 2008;11:4922-9.
177. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, Iannaccone L, Gallone A, Grandone E *et al.* Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the Budd-Chiari syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008;19:459-62.
178. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295–306.
179. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
180. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17:2503-16.
181. Bonamino M, Gomes F, Guimarães-Sternberg C, Scholl V, Praxedes M, Daumas A *et al.* Qualitative and quantitative analysis of JAK2V617F mutations

unravels higher responsiveness of JAK2+ ET patients treated with hydroxyurea. 14th Congress of the EHA, 2009, abstract 1790, ahead of print.

182. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353:1167-73.
183. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:216-29.
184. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E *et al*. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica* 2008;93:372-80.
185. Kaushansky K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of JAK2: Dameshek's 54 year old speculation comes of age. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:5-12.
186. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14-22.
187. Jerrard-Dunne P, Cloud G, Hassan A, Markus HS. Evaluating the genetic component of ischemic stroke subtypes. A family history study. *Stroke* 2003;34:1364-9.
188. Rosendaal FR, Van Hylckama Vlieg A, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003;1:1371-80.
189. Pardanani A, Lasho TL, Morice WG, Pruthi RK, Tefferi A. JAK2V617F is infrequently associated with arterial stroke in the absence of overt myeloproliferative disorder. *J Thromb Haemost* 2007;5:1784-5.
190. Dentali F, Squizzato A, Appio L, Brivio L, Ageno W. JAK2V617F mutation in patients with arterial thrombosis in the absence of overt myeloproliferative disease. *J Thromb Haemost* 2009;7:722-5.

-
191. Primignani M, Mannucci PM. The role of thrombophilia in splanchnic vein thrombosis. *Semin Liver Dis* 2008;28:293-301.
192. De Stefano V, Teofili L, Leone G, Michiels JJ. Spontaneous erythroid colony formation as the clue to an underlying myeloproliferative disorder in patients with Budd-Chiari syndrome or portal vein thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:411-8.
193. Fimognari FL, Violi F. Portal vein thrombosis in liver cirrhosis. *Intern Emerg Med* 2008;3:213-8.
194. Machado MM, Rosa ACF, da Mota OM, Cardoso DMM, Milhomem PM, Milhomem LM *et al.* Aspectos ultra-sonográficos da trombose da veia porta. *Radiol Bras* 2006;39:151-5.
195. Fiorini A, Chiusolo P, Rossi E, Za T, De Ritis DG, Ciminello A *et al.* Absence of the JAK2 exon 12 mutations in patients with splanchnic venous thrombosis and without overt myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 2009;84:126-7.
196. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, Grandone E, Guardascione MA, Margaglione M. A new JAK2 gene mutation in patients with polycythemia vera and splanchnic vein thrombosis. *Blood* 2007;110:2768-9.
197. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, Za T, Chiusolo P, Sica S *et al.* High prevalence of the JAK2V617F mutation in patients with extrahepatic portal vein thrombosis. *Hepatology* 2007;45:831-2.
198. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 2008;22:1299-307.
199. Heller PG, Lev PR, Salim JP, Kornblihtt LI, Goette NP, Chazarreta CD *et al.* JAK2V617F mutation in platelets from essential thrombocythemia patients: correlation with clinical features and analysis of STAT5 phosphorylation status. *Eur J Haematol* 2006;77:210-6.

-
200. Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Guglielmelli P. A quantitative assay for JAK2^{V617F} mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. *Leukemia* 2006;20:1055-60.
201. Ricksten A, Palmqvist L, Johansson P, Andreasson B. Rapid decline of JAK2V617F levels during hydroxyurea treatment in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008;93:1260-1.
202. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood* 2009;113:5246-9.
203. Atallah E, Verstovsek S. Prospect of JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:663-70.

IX. Anexos

Anexo 1. Ficha clínica UFRJ

FICHA DE RISCO TROMBÓTICO

Nº _____

Nome _____

Endereço _____

Bairro _____ Cidade _____ CEP _____

Estado _____ Telefones _____

Sexo (M/F) _____

Profissão _____

Peso _____ Altura _____ IMC (Kg/m²) _____

Obesidade (Y/N) _____

Naturalidade: _____

Ascendência (até bisavô): _____

Idade (no momento da trombose) _____

Data de Nascimento ____/____/____

Data de entrada no estudo: ____/____/____

Consangüinidade (Y/N) _____

Hospital _____ Nº prontuário _____

Médico _____ Tel.: _____

**TIPO DE ACIDENTE TROMBÓTICO PRINCIPAL (último, motivo do exame):
(SIM/NÃO)**

1. Trombose venosa profunda _____
2. Trombose venosa profunda + embolia pulmonar _____
3. Embolia pulmonar _____
4. Trombose venosa superficial _____
5. Acidente vascular encefálico _____
6. Doença arterial coronariana _____
7. Trombose arterial periférica _____
8. Trombose arterial visceral (outras) _____
9. Trombose retiniana _____
10. Perda fetal _____

LOCALIZAÇÃO DA TROMBOSE:

Trombose venosa profunda (TVP):

- Membro inferior _____
- Membro superior _____
- Mesentérica* _____
- Trombose da veia porta* _____
- Budd-Chiari* _____
- Veia cava _____
- Veia Renal _____
- Outra _____

Trombose venosa superficial (TVS):

Membro inferior _____

Membro superior _____

Outra _____

Classificação etiológica do AVE:

1. Aterosclerótico de gdes vasos

2. Cardiogênico

3. Lacunar (peq. vasos)

4. Arterial de etiologia definida

5. Arterial de etiologia indefinida (investigação completa)

6. Arterial de etiologia indefinida (investigação incompleta)

7. Ataque isquêmico transitório (TIA)

8. Venoso (TVC)

Trombose arterial periférica (TAP):

Membro inferior _____

Membro superior _____

Outra _____

Trombose arterial visceral (outras) _____

Mesentérica _____

Renal _____

Outra _____

Trombose retiniana _____

Artéria central _____

Veia central _____

Ramo da veia central _____

Hemisférica _____

EXANES DE IMAGEM:

US com Doppler: _____

Tomografia: _____

RNM: _____

Outros: _____

HISTÓRIA DE OUTROS FENÔMENOS TROMBÓTICOS: (SIM/NÃO) _____

NÚMERO TOTAL DE FENÔMENOS TROMBÓTICOS: _____

LOCALIZAÇÃO DOS OUTROS ACIDENTES TROMBÓTICOS:

DOENÇAS ASSOCIADAS:

Doença hepática _____

Doença Renal _____

Doença Autoimune _____

Câncer _____

Hemopatias malignas _____

Doença Mieloproliferativa _____

Hemoglobinopatia _____

Hipotireoidismo _____

Infecções _____

Outras

Comentários

MEDICAMENTOS USADOS NO MOMENTO DA TROMBOSE: _____

NÚMERO DE GESTAÇÕES NORMAIS: _____

PERDA FETAL ESPONTÂNEA (SIM /NÃO): _____

Número de perdas fetais / trimestre: 1º trimestre _____

2º trimestre _____

3º trimestre _____

FATORES DE RISCO (no momento da trombose principal):

Tabagismo (SIM /NÃO): _____

Número de cigarros/dia: _____

Tabagismo no passado (SIM /NÃO) : _____

Tabagismo no passado (quanto tempo) : _____

Tabagismo no passado (no. cigarros / dia) : _____

Pressão arterial: 1ª. Medida _____ 2ª. Medida _____

Medicamento para hipertensão: _____

Etilismo (SIM/NÃO): _____ N^o doses/dia _____

Dislipidemia (SIM /NÃO): _____ CT: _____ HDL _____ LDL _____ Tgl _____

Diabetes (SIM /NÃO): _____ Medicamento p/ diabetes:

Contraceptivo estrogênico atual (SIM/NÃO): _____

Há quanto tempo (meses): _____

Contraceptivo no passado (SIM/NÃO): _____

Por quanto tempo: _____ Parou quando: _____

Glicose: _____

Uso de hipoglicemiantes orais (SIM/NÃO), qual:

Varizes (SIM/NÃO): _____

Gestação (SIM/NÃO): _____ Trimestre da gestação: _____

Puerpério (SIM/NÃO): _____ Puerpério, dias: _____

Pós-operatório (SIM/NÃO): _____ Pós-operatório dias: _____

Esforço, tipo, quando (dias): _____

Traumatismo (SIM/NÃO) : _____ Traumatismo, tipo: _____

Viagem (SIM/NÃO) : _____ Duração da viagem (horas): _____

Viagem (qtos dias antes da trombose): _____

Em repouso no leito (SIM/NÃO): _____ Dias de repouso no leito: _____

Sedentarismo (atividade física < 4hs / semana, (SIM/NÃO): _____

Horas de atividade física / semana: _____

Grupo ABO e Rh: _____

Diâmetro da cintura: _____

Glaucoma antes da trombose retiniana (SIM/NÃO) _____

HISTÓRIA FAMILIAR:

História familiar TVP: (parentesco / idade) _____

História familiar IAM (parentesco / idade) : _____

História familiar AVE: (parentesco / idade)

MEDICAMENTOS EM USO NO MOMENTO DA COLHEITA DE SANGUE:

ESTUDO LABORATORIAL:

TAP – rel. P/C _____

TAP % _____

PTT – rel. P/C _____

P+C corrigido, (SIM/NÃO) : _____

T. Trombina (P-C) _____

Fibrinogênio _____

Plaquetas _____

VIII % _____

vW % _____

vWRCo % _____

ADENDO SOMENTE PARA PACIENTES COM TROMBOSE ESPLÂNCNICA
(TROMBOSE DE VEIA PORTA, MESENTÉRICA, ESPLÊNICA OU SÍNDROME DE
BUDD-CHIARI

FATORES LOCAIS:

- Cirrose Hepatite crônica Tumor hepático Cisto hepático
- Anormalidades vasculares hepáticas Pancreatite Doença inflamatória intestinal
- Trauma abdominal / Cirurgia abdominal recente Esplenectomia
- cateterismo umbilical

Outro: _____

FATORES SISTÊMICOS:

- Doença Mieloproliferativa (Anexo 1) Câncer
- Trombofilia (Anexo 2) Hemoglobinúria paroxística noturna
- Doença de Behçet

Outro: _____

APRESENTAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL (insuficiência hepática?):

FICHA CLÍNICA ANEXO 1**INVESTIGAÇÃO DE DOENÇA MIELOPROLIFERATIVA:****No momento da trombose abdominal:**

1. Hemograma (Data _____):

Hem: _____ Ht: _____ Hb: _____: Leuc: _____

Plaq: _____ Coment: _____

2. Avaliação do sangue periférico:

() Hemácias em lágrima () Padrão leuco-eritroblástico () Basofilia

3. Sinais Clínicos: () Eritromelalgia () Prurido () Trombose prévia

4. Exame físico: () Esplenomegalia Tamanho: _____

() Hepatomegalia Hepatimetria _____

5. Saturação Hb de O₂ >92%: () Sim () Não

6. História familiar de policitemia () Sim () Não

7. Eritropoietina: _____ () Baixa () Normal () Alta

8. Fosfatase alcalina neutrofílica: () Baixa () Normal

9. Ferritina: () baixa () normal

10. Mutação V617FJAK2: () Sim () Não () Não feito

11. BCR-ABL () Sim () Não () Não feito

12. Alteração Citogenética () Sim () Não Qual? _____

13. Medula óssea com hiperplasia megacariocítica? () Sim () Não

Data: _____

14. Medula óssea com panmielose? () Sim () Não

15. Medula óssea com atipia morfológica megacariocítica () Sim () Não

16. Grau de fibrose na MO: () ausente () pequeno () médio () alto

17. Presença de ferro na medula óssea () sim () não

CONCLUSÃO: () PV () TE () MP () LMC () Reacional

INVESTIGAÇÃO DE DOENÇA MIELOPROLIFERATIVA ATUAL:

_____ meses APÓS a trombose

1. Hemograma (Data _____):

Hem: _____ Ht: _____ Hgb: _____: Leuc: _____

Plaq: _____ Coment: _____

2. Avaliação do sangue periférico:

() Hemácias em lágrima () Padrão leuco-eritroblástico () Basofilia

3. Sinais Clínicos: () Eritromelalgia () Prurido () Trombose prévia

4. Exame físico: () Esplenomegalia Tamanho: _____

() Hepatomegalia Hepatimetria _____

5. Saturação Hgb de O₂ >92%: () Sim () Não

6. História familiar de policitemia () Sim () Não

7. Eritropoetina: () Baixa () Normal () Alta

8. Fosfatase alcalina neutrofílica: () Baixa () Normal

9. Ferritina: () baixa () normal

10. Mutação JAK2: () Sim () Não

11. BCR-ABL () Sim () Não

12. Alteração Citogenética () Sim () Não

Qual? _____

13. Formação de colônias eritróides "in vitro" () Sim () Não

14. Medula óssea com hiperplasia megacariocítica? () Sim () Não

Data: _____

15. Medula óssea com panmielose? () Sim () Não

16. Medula óssea com atipia morfológica megacariocítica () Sim () Não

17. Medula óssea com anisocitose megacariocítica () Sim () Não

18. Grau de fibrose na MO: () ausente () pequeno () medio () alto

19. Presença de ferro na medula óssea () sim () não

CONCLUSÃO: () PV () TE () MP () LMC () Reacional

FICHA CLÍNICA ANEXO 2

INVESTIGAÇÃO DE TROMBOFILIA: data: _____

FV Leiden: heterozigoto _____ homozigoto _____

PT 20210A : heterozigoto _____ homozigoto _____

Def. PC: _____

Def. PS: _____ tipo _____

Def. AT : _____

Antic. Lúpico: _____

Anticardiolipina _____

Confirmação: _____

Hiperhomocisteinemia: _____

Anexo 2. Ficha clínica UFMG

TROMBOFILIAS

Nome:
 Registro: _____
 Data de nascimento: _____

Sexo: _____

Fenômeno Tromboembólico

Data: _____ Idade: _____
 Local(is) de ocorrência: _____

Espontâneo: Sim _____ Não _____
 Diagnóstico de certeza: Sim _____ Não _____
 Qual: _____

Fatores adquiridos associados:

Trombose arterial:

Hipercolesterolemia _____ Hipertensão _____ Obesidade _____
 Diabetes Mellitus _____ Fumo _____ ICC ou FA _____

Trombose venosa:

Imobilização _____ Sepse _____ H.P.N. _____
 Cirurgia _____ Quimioterapia _____ D. Mieloproliferativa _____
 Neoplasia _____ Gravides _____ D. Autoimune _____
 Estrógeno _____ Pós-parto _____ Trauma _____
 Outros _____

Trombose Recorrente: Sim _____ Não _____
 Espontâneo: Sim _____ Não _____
 Diagnóstico de certeza: Sim _____ Não _____
 Qual: _____

Novos locais: _____

Recorrência em uso de anti-coagulantes: Sim _____ Não _____
 Anti-coagulação adequada: Sim _____ Não _____

Diagnóstico:

Dosagens realizadas normais (DR) Dosagens realizadas alteradas (DA)

TP _____	FV Leiden _____	VDRL _____
PTTa _____	G20210A _____	FAN _____
TT _____	MTHFr _____	Glicemia _____
Fibri _____	Homocisteína _____	Perfil lipídico _____
Fator VIII _____	VitB 12 _____	Função hepática _____
PCR _____	Ác fólico _____	Função renal _____
Antitrombina _____	ALUP _____	Hemograma _____
Proteína S _____	ACL IgG _____	Eletrof Hb _____
Proteína C _____	ACL IgM _____	Dímero D _____
Res Prot. C _____	ACL IgA _____	

História familiar: _____

Situações de risco: _____

Suspensão do AVK: Sim _____ Não _____

Quando: _____

Tempo de uso do AVK: _____

Risco de Sangramento com AVK: _____

Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido
UFRJ

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Serviço de Hematologia

Laboratório de Hemostasia

Tel: 25622460

Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do projeto: “PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO V617F DO GENE *JAK2* EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO, TROMBOSE VENOSA CEREBRAL OU TROMBOSE VENOSA ESPLÂNCNICA”.

A coagulação sangüínea é uma defesa de nosso organismo. Quando temos um sangramento, por exemplo quando nos cortamos, a coagulação é ativada para impedir que todo o nosso sangue se perca. Por vezes, ocorre a formação de coágulo sem necessidade. É a chamada trombose, que pode causar várias doenças, entre elas algumas formas de derrame cerebral. Algumas alterações genéticas foram descritas associadas à trombose.

Recentemente, alguns estudos observaram que uma alteração em um gene denominado *JAK2* está presente em alguns pacientes com trombozes de origem indeterminada.

O objetivo deste estudo é verificar se esta mutação está presente em um grupo de pacientes com duas formas de derrame cerebral (acidente vascular encefálico isquêmico ou trombose venosa cerebral), trombose da veia porta ou das veias hepáticas (Síndrome de Budd-Chiari), para conhecer melhor estas doenças e definir se a pesquisa desta mutação deveria ser realizada em todos os pacientes com trombose de origem indeterminada.

Estamos solicitando a sua autorização para participar deste estudo. Precisamos que você responda a um questionário e autorize a coleta de um pouco de sangue (1 tubo de 5 mL), que será realizada por pessoal treinado, com material estéril e descartável. Os riscos da coleta de sangue são mínimos. Entretanto, podem ocorrer hematomas, devido ao extravasamento do sangue na pele ou infecção no local da punção. Além disso, pode ocorrer uma dor de pequena intensidade, no momento em que a agulha penetra no seu braço.

Do sangue coletado será extraído o DNA (material genético encontrado no interior da célula). A análise do DNA, por meio de testes especializados, será realizada para a mutação V617F do gene *JAK2*.

O DNA obtido de cada paciente será utilizado exclusivamente neste projeto e será congelado no Laboratório de Hemostasia do Serviço de Hematologia do HUCFF-UFRJ. Esclarecemos que a eventual utilização desta amostra em novos estudos dependerá da aprovação de novos projetos pelo CEP, bem como de convocação do paciente para assinatura de novo Termo de consentimento livre e esclarecido.

A qualquer momento, você poderá se retirar do estudo, sem que tenha nenhum prejuízo pela saída ou pela recusa em participar.

O questionário, bem como os resultados obtidos neste estudo, serão de competência dos pesquisadores e serão mantidos em sigilo. Os resultados serão usados para publicação em literatura médica.

Estou ciente de que quaisquer informações a mim relacionadas obtidas nesta pesquisa, incluindo histórico médico, resultados laboratoriais e identificação pessoal, serão mantidas em sigilo. Autorizo a extração de DNA do meu sangue coletado para fins desta pesquisa médica. Permito, também, que os resultados obtidos neste estudo sejam usados para publicação em literatura médica.

Concordo em participar do estudo acima citado.

Nome do paciente

Assinatura do paciente

data

Assinatura do pesquisador

Tel:

data

Av. Brigadeiro Trompowsky s/n^o – 4^o andar – Ilha do Fundão – Rio de Janeiro/RJ – Brasil

CEP 21941-590 – tel:(21) 25622711 / 25622460

Anexo 4. Termo de consentimento livre e esclarecido

UFMG

Hospital das Clínicas
Universidade Federal de Minas Gerais

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME DA PESQUISA: “PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO V617F DO GENE *JAK2* EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO, TROMBOSE VENOSA CEREBRAL OU TROMBOSE VENOSA ESPLÂNCNICA”.
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Sandra Guerra Xavier CRM-MG: 31387
3. PROMOTOR: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Câncer-RJ e Universidade Federal de Minas Gerais.

A coagulação sanguínea é uma defesa do nosso organismo. Quando temos um sangramento, por exemplo, quando nos cortamos, a coagulação é ativada para impedir que todo o nosso sangue se perca. Por vezes, ocorre a formação de coágulo sem necessidade. É a chamada trombose, que pode causar várias doenças, entre elas algumas formas de derrame cerebral. Algumas alterações genéticas foram descritas associadas à trombose.

Recentemente, alguns estudos observaram que uma alteração em um gene denominado *JAK2* está presente em alguns pacientes com trombozes de origem indeterminada.

O objetivo deste estudo é verificar se esta mutação está presente em um grupo de pacientes com duas formas de derrame cerebral (acidente vascular encefálico isquêmico ou trombose venosa cerebral), trombose da veia porta ou das veias hepáticas (Síndrome de Budd-Chiari), para conhecer melhor estas doenças e definir se a pesquisa desta mutação deveria ser realizada em todos os pacientes com trombose de origem indeterminada.

Estamos solicitando a sua autorização para participar deste estudo. Precisamos que você responda a um questionário e autorize a coleta de um pouco de sangue (1 tubo de 5 mL), que será realizada por pessoal treinado, com material estéril e descartável. Os riscos da coleta de sangue são mínimos. Entretanto, podem ocorrer hematomas, devido ao extravasamento do sangue na pele ou infecção no local da punção. Além disso, pode ocorrer dor de pequena intensidade, no momento em que a agulha penetra no seu braço.

Do sangue coletado, será extraído o DNA (material genético encontrado no interior das células). A análise do DNA, por meio de testes especializados, será realizada para a mutação V617F do gene *JAK2*.

O DNA obtido de cada paciente será utilizado exclusivamente neste projeto e em seguida será armazenado em um banco de amostras, podendo ser utilizado em outros estudos que também tenham como objetivo conhecer melhor as trombozes de origem

indeterminada. Esclarecemos que a eventual utilização desta amostra em novos estudos dependerá da aprovação de novos projetos pelo COEP-UFMG, bem como da convocação do paciente para assinatura de novo Termo de consentimento livre e esclarecido.

A qualquer momento, você poderá se retirar do estudo, sem que tenha nenhum prejuízo pela saída ou pela recusa em participar.

O questionário, bem como os resultados obtidos neste estudo, serão de competência dos pesquisadores e serão mantidos em sigilo. Os resultados serão usados para publicação em literatura médica.

Belo Horizonte, de de 200 .

Dra. Sandra Guerra Xavier CRM-MG 31387
PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Av. Prof. Alfredo Balena, 190 –
6º andar – Depto. de Propedêutica
Complementar – Bairro Sta. Efigênia
CEP: 30130-100

TEL: 32489774/32489906

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte / Minas Gerais
Prédio da Reitoria – 7º andar / Sala: 7018
Telefone: (31) 3499-4592 /3499-4516 Fax: (31) 3499-4027

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu,, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento "ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA", que trata do projeto intitulado "PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO V617F DO GENE JAK2 EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO DE ORIGEM INDEFINIDA OU COM TROMBOSE VENOSA CEREBRAL", que tem como pesquisador responsável a Dra. Sandra Guerra Xavier, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido, bem como aos riscos e benefícios dos mesmos. Declaro ter pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas à pesquisa e ao tratamento a que serei submetido.
2. A liberdade de participar ou não do estudo, sendo que a minha decisão não terá qualquer influência no meu atendimento.
3. A liberdade de tirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
4. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.
5. O compromisso de que me será dada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
6. O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos de pesquisa.
7. O compromisso de que os resultados obtidos neste estudo serão usados para publicação em literatura médica.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto. Receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, de de 200 .

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do médico assistente

Anexos 5 e 6. Artigos publicados

- 9 Myles T, Yun TH, Hall SW, Leung LL. An extensive interaction interface between thrombin and factor V is required for factor V activation. *J Biol Chem* 2001; **276**:25143–25149.
- 10 Bostrom SL, Dagnelid E, Hansson GFH, Ulvinge C. Inhibition of thrombin-induced feedback activation of factor V: a potential pathway for inhibition of thrombin generation by melagatran. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; **15**:25–30.
- 11 Butenas S, Orfeo T, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Influence of bivalirudin on tissue factor-triggered coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; **18**:407–414.
- 12 Tanaka KA, Szlam F, Levy JH. The effect of aprotinin on activated protein C-mediated downregulation of endogenous thrombin generation. *Br J Haematol* 2006; **134**:77–82.
- 13 Tanaka K, Szlam F, Katori N, Sato N, Vega J, Levy J. The effects of argatroban on thrombin generation and hemostatic activation in vitro. *Anesth Analg* 2004; **99**:1283–1289.

Low prevalence of the *JAK2V617F* in patients with ischemic stroke or cerebral venous thrombosis

Sandra Guerra Xavier^{a,b}, Telma Gadelha^a, Rony Schaffel^a, Luciana Britto^a, Glicinia Pimenta^a, Daniel Dias Ribeiro^b, Adriano de Paula Sabino^b, Virginia Pires^c, Ilana Zalberg Renault^c and Nelson Spector^a

^aHematology Service, School of Medicine and University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, ^bFederal University of Minas Gerais, Belo Horizonte and ^cBone Marrow Transplantation Center (CEMO), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence to Nelson Spector, Rua Maria Angélica 326 ap. 501, 22461-152 Rio de Janeiro, Brazil
E-mail: spector@ufrj.br

Patients with chronic myeloproliferative disorders (CMPD), notably polycythemia vera and essential thrombocythemia, have a high incidence of both arterial and venous thromboses [1].

A gain-of-function mutation of the *JAK2* gene has been found in 90–98% of polycythemia vera patients, and in about 50% of those with thrombocythemia [2]. This valine-to-phenylalanine substitution at position 617 (V617F) results in constitutive tyrosine kinase activity, leading to abnormal hematopoiesis [2].

Very recently, the *JAK2V617F* mutation has been reported in patients with idiopathic Budd–Chiari syndrome, portal and mesenteric thrombosis, and less frequently in patients with cerebral vein thrombosis, without a previous diagnosis of CMPD [3–5]. On the other hand, one study in patients with thrombosis of usual sites and another in a group of patients with arterial stroke found a low prevalence of *JAK2V617F* in the absence of overt CMPD [6,7]. In the present study, we sought to determine the frequency of *JAK2V617F* in patients with ischemic stroke or cerebral venous thrombosis (CVT).

All patients with ischemic stroke and CVT referred to the hemostasis laboratory of two university hospitals between March 1998 and December 2006 were included. The diagnosis of ischemic stroke or CVT required the presence of typical abnormalities in the brain computed

tomography (CT), MRI or digital angiography. Patients with clinically overt CMPD were excluded. None of the patients with CVT had infections, trauma, malignancies or autoimmune diseases. A total of 178 patients with ischemic stroke and 44 patients with CVT were included. Both laboratories have a genomic DNA bank with DNA samples extracted from peripheral blood leukocytes of all patients referred for thrombophilia studies. The presence of *JAK2V617F* was evaluated by allele-specific PCR [2]. Samples from 28 patients with previously diagnosed polycythemia vera were used as positive controls, whereas samples from 20 bone marrow donors served as negative controls. Of the 28 polycythemia vera patients, 27 (96%) tested positive for *JAK2V617F*, and all bone marrow donors were negative.

The patients with ischemic stroke had a median age of 37 years (15–76) and 57% were females. *JAK2V617F* was detected in two (1%) of the 178 patients with ischemic stroke, both of undetermined etiology. The first patient was a 49-year-old man who had one episode of ischemic stroke in 2002. He had no evidence of splenomegaly and complete blood counts (CBC) were normal at the time of the ischemic stroke. His thrombophilia study was negative and the transesophageal echocardiogram and magnetic resonance angiography of intracranial arteries and extracranial arteries were normal. A CBC in July 2007 showed minor thrombocytosis ($550 \times 10^9/l$), with normal hemoglobin level and leukocyte count. The bone marrow biopsy, performed in July 2007, showed normal cellularity and foci of grouped megacaryocytes with a normal morphology. These features are suggestive of a subclinical myeloproliferative disorder. The second patient was a 68-year-old woman who suffered three episodes of ischemic stroke, the first 10 years earlier. The echocardiographic and angiographic studies were normal. She was homozygous for the 677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene, and had a plasmatic homocystein level of $30 \mu\text{mol/l}$ when she suffered the second stroke. She was treated with folic acid between the second and third stroke, with normalization of the homocystein plasma levels. There was no splenomegaly. The only abnormality in a recent CBC was anemia, with normal red cell morphology, and a high erythropoietin level. She is currently in coma, and a bone marrow biopsy was not performed for ethical reasons. In this patient, the hyperhomocysteinemia might have contributed to the risk of ischemic stroke. However, the normalization of homocystein plasma levels with folic acid did not prevent her from suffering the third stroke.

The 44 patients with CVT had a median age of 28 years (15–65 years) and 68% were women. None of them had *JAK2V617F*.

JAK2V617F has been recently identified as both a key pathogenetic event and a useful diagnostic tool in

patients with CMPD. Patients with these disorders are prone to arterial and venous thrombotic events. Recent studies have suggested that CMPD patients carrying *JAK2V617F* have an even higher risk of thrombotic complications, possibly due to increased platelet and leukocyte activation [8].

As venous thrombosis in CMPD often occurs in splanchnic or cerebral veins, there was immediate interest in studying the prevalence of the mutation in patients who present with such unusual venous thromboses without features of CMPD. In patients with splanchnic venous thrombosis, prevalences ranging from 31 to 59% have been observed [3–5].

None of our 44 patients with CVT had *JAK2V617F*. In the two other recent studies about this possible association, one study was also negative in 13 patients [9], whereas the other found a 4.8% positivity among 41 patients [5].

There is much less evidence implicating *JAK2V617F* in arterial thrombosis. In a recent evaluation of 137 patients with arterial stroke, two patients with the mutation were found, and in one of them, the bone marrow biopsy showed signs of subclinical CMPD [7].

Our data suggest that *JAK2V617F* is likely to be found in only a small fraction of patients with unexplained ischemic stroke or CVT. Nevertheless, in light of the substantial progress in the development of effective *JAK2V617F* inhibitors, these patients might well benefit from the identification of this mutation in the near future [10].

References

- 1 Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2004; **128**:275–290.
- 2 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al*. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; **365**:1054–1061.
- 3 Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, Westwood NB, Milojkovic D, Thanigaikumar M, *et al*. Prevalence of the activating *JAK2* tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 2006; **130**:2031–2038.
- 4 Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, Gianelli U, Fabris F, Reatti R, *et al*. Role of the *JAK2* mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* 2006; **44**:1528–1534.
- 5 De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, Za T, Farina G, Chiusolo P, *et al*. Incidence of the *JAK2* V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost* 2007; **5**:708–714.
- 6 Remacha AF, Estivill C, Sarda MP, Mateo J, Souto JC, Canals C, *et al*. The V617F mutation of *JAK2* is very uncommon in patients with thrombosis. *Haematologica* 2007; **92**:285–286.
- 7 Pardanani A, Lasho TL, Morice WG, Pruthi RK, Tefferi A. *JAK2V617F* is infrequently associated with arterial stroke in the absence of overt myeloproliferative disorder. *J Thromb Haemost* 2007; **5**:1784–1785.
- 8 Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the *JAK2* mutational status. *Haematologica* 2006; **91**:169–175.
- 9 Rossi D, Cresta S, Destro T, Vendramin C, Bocchetta S, De Paoli L. *JAK2V617F* in idiopathic venous thromboembolism occurring in the absence of inherited or acquired thrombophilia. *Br J Haematol* 2007; **138**:813–814.
- 10 Pardanani A, Hood J, Lasho T, Levine RL, Martin MB, Noronha G, *et al*. TG101209, a small molecule *JAK2*-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated *JAK2V617F* and *MPLW515L/K* mutations. *Leukemia* 2007; **21**:1658–1668.

JAK2V617F Mutation in Patients with Splanchnic Vein Thrombosis

Sandra Guerra Xavier · Telma Gadelha · Glicínia Pimenta · Angela Maria Eugenio · Daniel Dias Ribeiro · Fernanda Mendes Gomes · Martin Bonamino · Ilana Renault Zalberg · Nelson Spector

Received: 5 May 2009 / Accepted: 19 July 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract

Background Splanchnic vein thrombosis can be the presenting manifestation of myeloproliferative neoplasms. However, the diagnosis of a myeloproliferative neoplasm in these patients is often problematic, and more objective criteria are needed.

Aim To determine the frequency of the mutation *JAK2V617F* in patients with splanchnic vein thromboses.

Methods A consecutive series of 108 adult patients with portal vein thrombosis ($n = 77$) and Budd-Chiari syndrome ($n = 31$) referred for hemostasis evaluation was retrospectively studied, with a median follow-up of 51 months (1–104).

Results One or more prothrombotic risk factors were present in 63% of the patients. Twenty-four (22%) out of the 108 patients presented the *JAK2V617F*, including 2

S. G. Xavier · T. Gadelha · G. Pimenta ·
A. M. Eugenio · N. Spector
Hematology Service, Department of Internal Medicine,
University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal University
of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

S. G. Xavier
e-mail: sandraguerra.xavier@gmail.com

T. Gadelha
e-mail: telma.gadelha@gmail.com

G. Pimenta
e-mail: gliciniapimenta@uol.com.br

A. M. Eugenio
e-mail: angelaeugenio@yahoo.com.br

S. G. Xavier
Department of Medical Propedeutics, Federal University
of Minas Gerais Medical School, Belo Horizonte, Brazil

D. D. Ribeiro
Hematology Service, Hospital das Clínicas,
Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil
e-mail: ddribeiro@terra.com.br

F. M. Gomes · I. R. Zalberg
Molecular Biology Laboratory, Bone Marrow Transplantation
Center (CEMO), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro,
Brazil

F. M. Gomes
e-mail: fernanda.mendesg@gmail.com

I. R. Zalberg
e-mail: zalberg@inca.gov.br

M. Bonamino
Division of Experimental Medicine, Coordenação de Pesquisa
(CPQ), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: mbonamino@inca.gov.br

N. Spector (✉)
Rua Maria Angélica 326 ap. 501,
Rio de Janeiro 22461-152, Brazil
e-mail: spector@ufrj.br; nelson.spector@gmail.com

S. G. Xavier
Rua dos Dominicanos 140/201, Serra, Belo Horizonte,
MG CEP: 30210-480, Brazil

T. Gadelha · G. Pimenta · A. M. Eugenio
Rua Rodolpho Paulo Rocco 255, Hospital Universitário,
sala 4A12, Cidade Universitária, Ilha do Fundão,
Rio de Janeiro, RJ CEP: 21941-913, Brazil

F. M. Gomes · I. R. Zalberg
Praça da Cruz Vermelha 23, 6° andar, Centro,
Rio de Janeiro, RJ CEP: 20230-130, Brazil

M. Bonamino
Rua André Cavalcanti 37, 6° andar, Centro,
Rio de Janeiro, RJ CEP: 20231-050, Brazil

cirrhotic patients. Most had a low mutated allele burden (median 16.5%). *JAK2V617F* was present in all four patients with a previous diagnosis of a myeloproliferative neoplasm. In nine *JAK2V617F*-positive patients, the diagnosis of a myeloproliferative neoplasm was made at the thrombosis work-up, during follow-up or after *JAK2V617F* detection. Among the other 11 patients carrying the mutation, 2 patients have died, 4 had no evidence suggesting a myeloproliferative neoplasm, 1 had a normal bone marrow biopsy, and the other 4 could not be persuaded to undergo a biopsy. Among the patients without an overt myeloproliferative neoplasm, 15 out of 99 (15%) presented the *JAK2V617F* mutation. None of the *JAK2V617F*-negative patients have developed signs of a myeloproliferative neoplasm during follow-up.

Conclusions Our findings suggest that *JAK2V617F* occurs in a high proportion of patients with splanchnic vein thrombosis, and reinforces the diagnostic utility of *JAK2V617F* testing in this setting.

Keywords Budd-Chiari syndrome · Portal vein thrombosis · Liver cirrhosis · Myeloproliferative neoplasms · *JAK2* · Allele burden

Introduction

Thrombotic complications are a main concern in patients with myeloproliferative neoplasms (MPNs). In a large cohort of patients with polycythemia vera (PV), 38% had a positive history of thrombotic events even before the diagnosis of PV. Three-quarters of those were arterial thromboses, while one-quarter were venous thromboses. These events were prevalent in the 5 years before diagnosis, and remained frequent for over a decade after diagnosis [1]. Patients with MPN have a particularly high rate of thromboses in large abdominal veins, reaching 5–10% in patients with PV and essential thrombocythemia (ET) [2, 3]. Conversely, overt myeloproliferative neoplasms can be found in 15–50% of the patients with splanchnic vein thromboses [4–7].

However, the diagnosis of MPNs in patients with splanchnic thromboses is often problematic, because at the time of the thrombotic event, occult bleeding, hemodilution and hypersplenism due to portal hypertension may mask the increase in blood cell counts. Moreover, the finding of splenomegaly, a hallmark of MPNs, may be attributed in this context solely to the splanchnic thrombosis [8]. These difficult clinical cases have been referred to as latent or occult MPNs. Endogenous erythroid colony (EEC) formation assays and serum erythropoietin levels have been shown to be unreliable for this diagnosis [9, 10], and more objective clues are clearly needed.

Recently, a gain-of-function mutation of the gene encoding the *JAK2* tyrosine kinase that results in a valine-to-phenylalanine substitution at position 617 (V617F) has been described [11–14]. The *Janus kinase 2* (*JAK2*) is a cytoplasmic tyrosine kinase that plays a central role in signal transduction from multiple hematopoietic growth factor receptors [15]. The *JAK2V617F* mutation is associated with a growth factor-independent phenotype, leading to abnormal hematopoiesis. This mutation has been found in 90–98% of PV patients, and in about 50% of those with ET or primary myelofibrosis (PMF) [16].

Several groups have investigated the prevalence of *JAK2V617F* in patients with arterial and venous thromboses. The mutation was present in 18–74% of patients with splanchnic thromboses without an overt MPN, suggesting that it might be a useful diagnostic tool in this setting [17–21]. On the other hand, *JAK2V617F* is rare or absent in arterial or venous thromboses of other sites [22–26].

In the present study, the frequency of *JAK2V617F* in patients with splanchnic vein thrombosis was studied, and the utility of this mutation in the diagnosis of atypical or occult myeloproliferative neoplasm was evaluated.

Methods

Patients

The records of 133 patients with splanchnic vein thrombosis, referred to the hemostasis laboratory in two university hospitals for thrombophilic studies between January 2000 and July 2008, were reviewed. For the diagnosis of splanchnic vein thrombosis, typical abnormalities in Doppler ultrasonography, abdominal computed tomography or magnetic resonance imaging were required. Patients with evidence of cancer of the liver, pancreas or bile ducts were excluded. The availability of clinical and laboratory data, and the availability of a DNA sample suitable for analysis, were required for eligibility. A total of 108 patients with splanchnic vein thrombosis were included irrespective of the presence of an overt MPN. In both hospitals, bone marrow studies were not routinely performed in patients with splanchnic vein thrombosis during the study period.

Medical records were examined to obtain information about acquired prothrombotic factors such as oral contraception, pregnancy, post-partum, trauma, abdominal surgery, previous splenectomy, schistosomiasis, cirrhosis, other liver diseases, and infections. Laboratory data for prothrombotic factors were also collected, as well as complete blood counts at the time of diagnosis and during follow-up. Results for Factor V Leiden, prothrombin

estimated comparing respective peak areas to the sum of both, considered as 100%. A standard curve was generated using two plasmids containing a *JAK2* mutated and a *JAK2* wild-type inserts mixed in various proportions. The squared correlation coefficient (R^2) achieved was greater than 0.99. The assay detected the V617F mutated allele with an analytic sensitivity of 2% [30].

Samples from 20 patients previously diagnosed with PV [27] were used as positive controls, whereas samples from 30 healthy subjects served as negative controls. Eighteen (90%) PV patients tested positive for *JAK2V617F*, and all healthy subjects were negative.

Statistical Analysis

Comparisons between groups were made with the chi-square test (two-sided) or the Mann–Whitney test, as appropriate. All numeric calculations and statistical analysis were made with SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, USA), and a P value $\leq .05$ was considered statistically significant.

Results

The demographic characteristics, prothrombotic risk factors and *JAK2V617F* mutational status of the 108 patients are shown in Table 1. The median age among the 108 patients enrolled was 39 years (range, 17–74), and there were 57 women. Thrombosis involved the portal vein in 77 patients and the hepatic veins in 31 (Budd-Chiari syndrome). A combination of portal vein thrombosis with mesenteric vein and/or splenic vein thromboses was observed in 22 patients, and a combination of Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis was observed in four patients, who were analyzed in the Budd-Chiari syndrome group.

Overall, one or more prothrombotic factors were present in 63% of the patients. The most frequently acquired prothrombotic factors were liver cirrhosis, other chronic liver diseases (including six patients with schistosomiasis), abdominal surgery (including seven patients with previous splenectomy), and oral contraceptive use. Four patients had a diagnosis of myeloproliferative neoplasm before the occurrence of the thrombotic event, while five other patients were found to have an MPN during evaluation for the splanchnic vein thrombosis. Factor V Leiden was identified in six patients and prothrombin G20210A in five (all heterozygous). The antiphospholipid syndrome was present in 2 out of 52 patients tested. Nine patients carried combined acquired and/or inherited prothrombotic factors.

The *JAK2V617F* mutation was found in 24 (22%) patients, including 16 (21%) of the 77 patients with portal vein thrombosis and 8 (26%) of the 31 patients with Budd-Chiari syndrome. Among the patients without an overt

Table 1 Demographic characteristics, thrombosis location, prothrombotic risk factors and *JAK2V617F* mutational status

	BCS	PVT
<i>Patients, n</i>	31	77
Sex (F/M)	20/11	37/40
Median age, years (range)	33 (17–50)	42 (17–74)
<i>Acquired risk factors</i>		
Liver cirrhosis	7	13
Other chronic liver diseases	0	13
Abdominal surgery	0	12
Oral contraceptive use	7	4
MPN	5	4
APS	1	1
Abdominal trauma	0	1
Sepsis	0	1
<i>Inherited risk factors</i>		
Factor V Leiden	3	3
G20210A mutation of prothrombin gene	1	4
<i>JAK2V617F mutational status</i>		
<i>JAK2V617F</i> , all patients (%)	8 (26)	16 (21)
<i>JAK2V617F</i> , MPN patients excluded (%)	3 (11)	12 (16)

APS Antiphospholipid antibody syndrome, BCS Budd-Chiari syndrome, MPN myeloproliferative neoplasm, PVT portal vein thrombosis

MPN, 15 out of 99 (15%) presented the *JAK2V617F* mutation. The clinical and laboratory data of the 24 patients with *JAK2V617F* are listed in Table 2. In these patients, allele quantification showed a low proportion of the mutated allele, not exceeding 50% (median 16.5%, range 2–44.2%).

Patients with the *JAK2V617F* mutation presented substantially higher leukocyte counts ($9.3 \times 10^9/l$ vs. $5.4 \times 10^9/l$; $P < 0.001$) and platelet counts ($477.5 \times 10^9/l$ vs. $141 \times 10^9/l$; $P < 0.001$) than those with the wild-type. These differences remained when splenectomized patients and those with an overt MPN were excluded from the analysis. The prevalence of *JAK2V617F* was similar in patients with or without prothrombotic factors (25% vs. 18%, respectively; $P = 0.4$).

JAK2V617F was found in all four patients with a previous diagnosis of MPN (one PV, two ET, and one PMF). In five positive patients, a diagnosis of MPN was made at the thrombosis work-up (three PV and two ET). With a median follow-up of 51 months (range 1–104), three more patients developed evidences of an MPN (two ET and one PMF). None of the *JAK2V617F*-negative patients have so far developed signs of an MPN during follow-up.

Among the other 12 *JAK2V617F*-positive patients who did not fulfill the criteria for an MPN, 8 had leukocytosis, thrombocytosis and/or splenomegaly. A bone marrow biopsy was performed in only two patients. It was suggestive of a prefibrotic primary myelofibrosis in one patient, and

Table 2 Characteristics of patients presenting the *JAK2V617F* mutation

Patient	Sex	Age (years)	Type of thrombosis	Inherited risk factors	Acquired risk factors	MPN
1	Male	41	BCS	PT G20210A	Post-splenectomy	NA ^a
2	Female	74	PVT	No	None	PV known
3	Female	28	BCS	No	None	PV during work-up
4	Female	23	PVT	No	Post-splenectomy/OC	NA ^a
5	Female	24	BCS	No	OC	PV during work-up
6	Male	42	BCS	No	None	PV during work-up
7	Female	56	PVT	No	None	NA ^a
8	Female	64	PVT	No	None	NA
9	Female	22	BCS	No	None	NA
10	Male	63	PVT	No	None	ET during work-up
11	Male	50	PVT	No	APS	NA
12	Male	50	BCS	No	None	PV known
13	Male	43	PVT	No	None	Prefibrotic PMF after <i>JAK2V617F</i> detection
14	Female	24	BCS	No	OC	ET during work-up
15	Male	42	PVT	No	Schistosomiasis	NA
16	Female	58	PVT	No	Schistosomiasis	NA
17	Male	27	PVT	No	None	No MPN
18	Female	43	PVT	No	OC	ET known
19	Female	47	PVT	No	None	ET after 12 months of follow-up
20	Female	48	PVT	No	OC	NA ^a
21	Female	45	PVT	No	Hepatitis B	PMF after 8 years of follow-up
22	Female	28	PVT	No	Abdominal Trauma/OC	NA
<i>Cirrhotic patients</i>						
1	Female	34	PVT	No	None	ET known
2	Female	36	BCS	No	None	ET after 5 years of follow-up

APS Antiphospholipid syndrome, BCS Budd-Chiari syndrome, ET essential thrombocythemia, MPN myeloproliferative neoplasm, OC oral contraceptives, PMF primary myelofibrosis, PT prothrombin, PV polycythemia vera, PVT portal vein thrombosis, NA bone marrow aspirate/ biopsy not available

^a Patients with no clinical findings suggestive of MPN

normal in the other one. Two of these eight patients have died from other causes, with no signs of MPN, and the other four could not be persuaded by their physicians to undergo a biopsy.

The remaining four *JAK2V617F*-positive patients, including two with a previous splenectomy, had no suggestive findings of an MPN (Fig. 2).

Liver cirrhosis was present in 20 patients at the time of thrombosis. Two of these patients (10%) presented the *JAK2V617F*. One had a previous diagnosis of ET, while the other developed ET 5 years after the thrombotic episode. Their clinical and laboratory data are also detailed in Table 2.

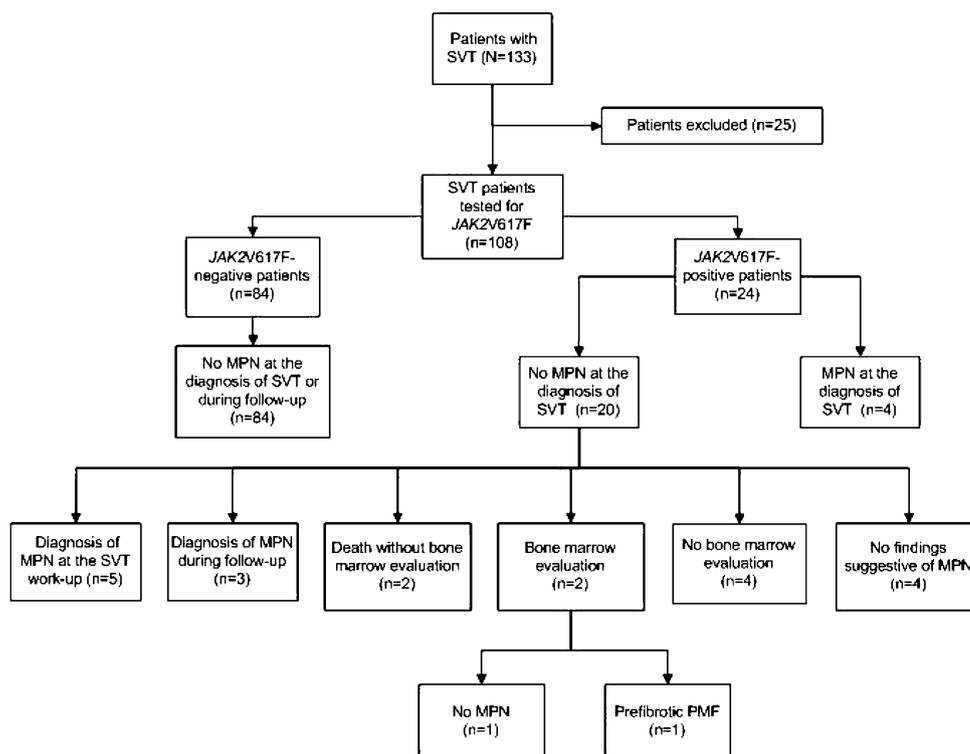
Discussion

Venous thrombosis is a multicausal disease, in which genetic and acquired prothrombotic factors interact

dynamically [32]. Splanchnic vein thrombosis is frequently associated to prothrombotic conditions as inherited thrombophilia (factor V Leiden, prothrombin G20210A or coagulation inhibitor deficiencies) or acquired risk factors [33]. Among the acquired factors associated with splanchnic vein thromboses, there are systemic conditions such as MPNs, oral contraceptive use and chronic inflammatory diseases, and abdominal causes such as cirrhosis, other chronic liver diseases, local inflammation, trauma, surgical injury to the portal venous system, and tumors of abdominal organs [33]. MPNs and cirrhosis are the leading causes in the developed world [4, 34, 35]. However, the diagnosis of MPN in this context is often problematic, and the availability of the *JAK2V617F* as a diagnostic tool could be particularly useful in these patients.

In the present study, all patients with splanchnic vein thrombosis were included, except those with abdominal neoplasms. Liver cirrhosis, oral contraceptive use, and MPN were the most frequent prothrombotic factors

Fig. 2 Schematic representation of the 108 patients. *MPN* Myeloproliferative neoplasm, *PMF* primary myelofibrosis, *SVT* splanchnic vein thrombosis



present. A previous splenectomy was associated with portal vein thrombosis in seven patients and schistosomiasis in six. In developing countries, where schistosomiasis is endemic, there are anecdotal reports of its association with portal vein thrombosis, although no systematic study has been conducted as yet.

The *JAK2V617F* mutation was present in 21% of patients with portal vein thrombosis and in 26% of the Budd-Chiari syndrome patients. Previous reports have ranged from 17 to 34% in portal vein thrombosis and from 40 to 58% in the Budd-Chiari syndrome [17–19, 36–38]. These discrepancies are probably due to different inclusion criteria, to the small number of patients studied, and to the sensitivity of the assays used to detect *JAK2V617F*.

Of note, among 24 patients carrying *JAK2V617F*, only 4 had a previous diagnosis of MPN and 5 were diagnosed with an MPN at the moment of thrombosis. Three patients were diagnosed with an MPN during follow-up and another patient was found to have a prefibrotic primary myelofibrosis after *JAK2V617F* positive testing, representing cases of latent forms of MPN. On the other hand, none of the *JAK2V617F*-negative patients developed signs of an MPN during follow-up. This demonstrates the utility of *JAK2V617F* testing in the setting of splanchnic vein thromboses. Furthermore, it underlines the importance of bone marrow histologic assessment, not only in *JAK2V617F*-positive patients to confirm and classify the MPN, but also in negative patients, due to the possibility of *JAK2V617F*-negative cases, especially in ET and PMF.

Several mechanisms have been proposed to contribute to the acquired prothrombotic state of MPN patients, including platelet and red blood cell abnormalities, and leukocytosis [39]. However, the reasons for the high rate of splanchnic thromboses in MPN are not established. It has recently been shown, in two patients with PV and BCS, that the endothelial cells in hepatic venules were homozygous for the *JAK2V617F*. The authors speculate that, at least in a subpopulation of patients, the disease might originate from a common cell of origin for hematopoietic and endothelial cells [40].

In patients with MPN, *JAK2* mutant allele burden influences disease phenotypes and clinical outcome [41–43]. In agreement with other studies [19, 24, 36], *JAK2V617F*-positive patients had a low median allele burden (16.5%), never exceeding 50%, suggesting that most, if not all, were heterozygous. However, a prospective study with appropriate preparation of purified granulocytes is needed to better characterize this matter.

In this study, the *JAK2V617F* mutation was similarly present in patients with and without prothrombotic risk factors (17/68–25% vs. 7/40–18%), in agreement with previous reports [19, 44, 45]. Therefore, a full clinical and laboratory evaluation is mandatory in all patients, even when a prothrombotic factor is known to be present.

Patients with cirrhosis are often considered to have secondary thromboses, and are treated without further etiologic evaluation. In the few cases reported in which *JAK2V617F* mutation was studied in cirrhotic patients, it

was found to be negative [44, 46]. In the present series, however, *JAK2V617F* was detected in 2 (10%) of 20 cirrhotic patients; one had a previous diagnosis of ET, while the other developed ET 5 years after the thrombotic episode. Larger studies are needed in cirrhotic patients with splanchnic vein thrombosis to determine the frequency and the role of *JAK2V617F*. Meanwhile, it seems advisable to also search for the mutation in cirrhotic patients in this setting.

The present study had limitations. Its retrospective nature implies that there were missing data, especially regarding the availability of bone marrow biopsies. Also, the studied patients were referred to hemostasis laboratories, thus representing a selected group whose results may not fully apply to less selected patients with splanchnic vein thrombosis.

In conclusion, the findings in this study suggest that *JAK2V617F* mutation is often present in patients with splanchnic vein thrombosis, including cirrhotic patients. The finding of an MPN in these patients has clinical relevance, because the history of a thrombotic episode is an important risk factor for recurrent thrombosis [39] and because of its therapeutic implications [39]. Carefully planned prospective studies are necessary to elucidate the role of the mutation and of the mutant allele burden in the proper diagnosis and management of splanchnic vein thrombosis.

Acknowledgments Nelson Spector is supported by grants from Faperj and CNPq. Ilana Renault Zalberg is supported by grants from the Swiss Bridge Foundation.

References

1. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005;23:2224–2232.
2. Anger BR, Seifried E, Scheppach J, Heimpel H. Budd-Chiari syndrome and thrombosis of other abdominal vessels in the chronic myeloproliferative diseases. *Klin Wochenschr*. 1989;67:818–825.
3. Bazzan M, Tamponi G, Schinco P, et al. Thrombosis-free survival and life expectancy in 187 consecutive patients with essential thrombocythemia. *Ann Hematol*. 1999;78:539–543.
4. Denninger MH, Chait Y, Casadevall N, et al. Cause of portal or hepatic venous thrombosis in adults: the role of multiple concurrent factors. *Hepatology*. 2000;31:587–591.
5. Janssen HLA, Meinardi JR, Vleggaar FP, et al. Factor V Leiden mutation, prothrombin gene mutation, and deficiencies in coagulation inhibitors associated with Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: results of a case-control study. *Blood*. 2000;96:2364–2368.
6. Valla D. Hepatic vein thrombosis (Budd-Chiari Syndrome). *Semin Liver Dis*. 2002;22:5–14.
7. Primignani M, Martinelli I, Bucciarelli P, et al. Risk factors for thrombophilia in extrahepatic portal vein obstruction. *Hepatology*. 2005;41:603–608.
8. Chait Y, Condat B, Cazals-Hatem D, et al. Relevance of the criteria commonly used to diagnose myeloproliferative disorder in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol*. 2005;129:553–560.
9. Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*. 2002;100:4272–4290.
10. Thurmes PJ, Steensma DP. Elevated serum erythropoietin levels in patients with Budd-Chiari syndrome secondary to polycythemia vera: clinical implications for the role of *JAK2* mutation analysis. *Eur J Haematol*. 2006;77:57–60.
11. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054–1061.
12. James C, Ugo V, Le-Couédic J-P, et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005;434:1144–1148.
13. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and agnogenic myeloid metaplasia. *Cancer Cell*. 2005;7:387–397.
14. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779–1790.
15. Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood*. 2006;107:4214–4222.
16. Smith CA, Fan G. The saga of *JAK2* mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol*. 2008;39:795–810.
17. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, et al. Incidence of the *JAK2V617F* mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost*. 2007;5:708–714.
18. Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, et al. Prevalence of the activating *JAK2* tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology*. 2006;130:2031–2038.
19. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, et al. Role of the *JAK2* mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology*. 2006;44:1528–1534.
20. Goulding C, Uttenthal B, Foroni L, et al. The *JAK2*^{V617F} tyrosine kinase mutation identifies clinically latent myeloproliferative disorders in patients presenting with hepatic or portal vein thrombosis. *Int J Lab Haematol*. 2008;30:415–419.
21. Regina S, Herault O, D'Alteroche L, Binet C, Gruel Y. *JAK2* V617F is specifically associated with idiopathic splanchnic vein thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5:859–861.
22. Remacha AF, Estivill C, Sarda MP, et al. The V617F mutation of *JAK2* is very uncommon in patients with thrombosis. *Haematologica*. 2007;92:285–286.
23. Pardanani A, Lasho TL, Morice WG, Pruthi RK, Tefferi A. *JAK2V617F* is infrequently associated with arterial stroke in the absence of overt myeloproliferative disorder. *J Thromb Haemost*. 2007;5:1784–1785.
24. Colaizzo D, Amitrano L, Iannaccone L, et al. Gain-of-function gene mutations and venous thromboembolism: distinct roles in different clinical settings. *J Med Genet*. 2007;44:412–416.
25. Pardanani A, Lasho TL, Hussein K, et al. *JAK2V617F* mutation screening as part of the hypercoagulable work-up in the absence of splanchnic venous thrombosis or overt myeloproliferative neoplasm: assessment of value in a series of 664 consecutive patients. *Mayo Clin Proc*. 2008;83:457–459.
26. Xavier SG, Gadelha T, Schaffel R, et al. Low prevalence of the *JAK2V617F* in patients with ischemic stroke or cerebral venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008;19:468–469.

27. Pierre R, Imbert M, Thiele J, et al. WHO classification of the chronic myeloproliferative diseases (CMPD) polycythemia vera, chronic idiopathic myelofibrosis, essential thrombocythemia and CMPD unclassifiable. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization Classification of Tumours, vol. 3. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001:32–44.
28. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007;110:1092–1097.
29. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989;17:2503–2516.
30. Bonamino M, Gomes F, Guimarães-Sternberg C, et al. *Qualitative and Quantitative Analysis of JAK2V617F Mutations Unravels Higher Responsiveness of JAK2 + ET Patients Treated with Hydroxyurea*. 14th Congress of the EHA, 2009, abstract 1790 (ahead of print).
31. Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106:2162–2168.
32. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*. 1999;353:1167–1173.
33. Primignani M, Mannucci PM. The role of thrombophilia in splanchnic vein thrombosis. *Semin Liver Dis*. 2008;28:293–301.
34. De Stefano V, Teofili L, Leone G, Michiels JJ. Spontaneous erythroid colony formation as the clue to an underlying myeloproliferative disorder in patients with Budd-Chiari syndrome or portal vein thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23:411–418.
35. Fimognari FL, Violi F. Portal vein thrombosis in liver cirrhosis. *Intern Emerg Med*. 2008;3:213–218.
36. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, et al. The JAK2V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5:55–61.
37. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FWG, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood*. 2008;11:4922–4929.
38. Bayraktar Y, Harmanci O, Büyüksak Y, et al. JAK2V617F mutation in patients with portal vein thrombosis. *Dig Dis Sci*. 2008;53:2778–2783.
39. Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia*. 2008;22:2020–2028.
40. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood*. 2009;113:5246–5249.
41. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006;355:2452–2466.
42. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood*. 2007;110:4030–4036.
43. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008;22:1299–1307.
44. McMahon C, Abu-Elmagd K, Bontempo FA, Kant JA, Swerdlow SH. JAK2 V617F mutation in patients with catastrophic intra-abdominal thromboses. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:736–743.
45. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, et al. High prevalence of the JAK2 V617F mutation in patients with extrahepatic portal vein thrombosis. *Hepatology*. 2007;45:831–832.
46. Boissinot M, Lippert E, Girodon F, et al. Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2–V617F mutation and endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis. *Blood*. 2006;108:3223–3224.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)