

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS: PESQUISA DO GENE DE FUSÃO *BCR-ABL1* E DA MUTAÇÃO *JAK2V617F*.

George Douglas de Lima Melo<sup>1</sup>; Marcos André Cavalcanti Bezerra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina – CCB – UFPE; E-mail: ger.douglas@hotmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Genética – CCB – UFPE. E-mail: macbezerra@gmail.com

**Sumário:** Neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPCs) são doenças onco-hematológicas originadas de alteração clonal da célula-tronco hematopoiética e caracterizadas pela proliferação anormal de precursores mielóides. As NMPC's podem ser reagrupadas segundo mutações e/ou rearranjos de genes codificadores de tirosina quinases, onde se destacam o gene *ABL1* que encontra-se frequentemente associado à translocação cromossômica t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR-ABL1* ou cromossomo Filadélfia (Ph), e o gene *Janus quinase 2 (JAK2)*, resultando na substituição da valina por fenilalanina na posição 617 (*JAK2 V617F*). O objetivo desse estudo foi caracterizar pacientes com suspeita clínica de NMPC's do ponto de vista molecular, classificando os pacientes quanto a presença do gene de fusão *BCR/ABL1* p210 e classificá-los ainda quanto a presença/ausência da mutação *JAK2V617F*, oriundos do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HCPE), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE e da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). A detecção da translocação t(9;22)(q34;q11)-*BCR/ABL1* foi realizada através da técnica de *Nested PCR* enquanto a mutação *JAK2V617F* realizada pela técnica PCR-RFLP. Das 180 análises realizadas com suspeita clínica de NMPCs 21,3% (30/141) foram positivas para a mutação *JAK2V617F* e 23,1 (9/39) para a mutação *BCR/ABL1*. A pesquisa dessas mutações contribuem para a conclusão do diagnóstico clínico/laboratorial dos pacientes com suspeita clínica de NMPCs

**Palavras-chave:** bcr/abl; diagnóstico molecular; jak2v617f; nmpc.

### INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPCs) são doenças onco-hematológicas originadas de uma alteração clonal da célula-tronco hematopoiética e caracterizadas pela proliferação anormal de precursores mielóides da medula óssea com consequente acúmulo de uma ou mais linhagens de células maduras mielóides no sangue periférico e tecidos (Milosevic, 2013 ; Kralovics, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece como NMPCs quatro principais entidades: a Leucemia Mielóide Crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP). Ainda fazem parte deste grupo a leucemia neutrofílica crônica, leucemia eosinofílica crônica, mastocitose e neoplasias mieloproliferativas não classificáveis (Vardiman, 2009).

Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa com uma incidência de 1-2 casos por 100.000 adultos, e é responsável por 15% de casos recém-diagnosticados de leucemia em adultos. O evento central para a patogênese da LMC é a fusão do gene *ABL* localizado no cromossomo 9, com o gene *BCR* localizado no cromossomo 22, que resulta na expressão de uma oncoproteína de fusão, decorrente da translocação (9;22)(q34.1;q11.2), resultando no gene híbrido *BCR-ABL*. O *BCR-ABL* é uma tirosina-quinase constitutivamente ativa que promove o crescimento e a replicação celular de forma exacerbada. A LMC é classificada em três fases; Fase Crônica, Fase

Acelerada e Fase Blástica. Esses eventos moleculares traduzem-se clínica e laboratorialmente por hiperplasia mielóide, leucocitose, neutrofilia, basofilia e hepatoesplenomegalia, de acordo com a fase evolutiva. (Jabbour et al 2014) A identificação da translocação t(9;22)(q34;q11)/*BCR/ABL1* ponto de quebra p210 na célula progenitora hematopoiética por análise citogenética ou a partir de técnicas de biologia molecular concretiza o diagnóstico da LMC, sendo considerado o padrão ouro (Vardiman et al., 2009). A mutação somática de maior frequência nas NMPCs Ph-negativo é a p.Val617Phe (*JAK2* V617F) (Baxter et al. 2005; Kralovics et al. 2005; Zhao et al. 2005; Lundberg et al. 2014; Zhang et al. 2014). Esta mutação ocorre, no éxon 14 do gene *JAK2* (localização 9p24), em que há a substituição de uma guanina por uma timina, resultando na troca de uma valina por fenilalanina na posição 617. A presença da *JAK2*V617F está associada a ativação constitutiva da proteína *JAK2*, um receptor do tipo tirosina-quinase responsável pela transdução de sinais de proliferação e divisão celular (Chen and Mullally 2011; Toms et al. 2013). A identificação da *JAK2* V617F, é hoje parte integrante de uma abordagem diagnóstica para as NMPCs. Tem como principal objetivo caracterizar os pacientes com suspeita de neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPCs) do ponto de vista molecular, classificando estes pacientes quanto a presença do gene de fusão *BCR/ABL1* (cromossomo Ph) ponto de quebra p210 e classifica-los ainda quanto a presença ou ausência da mutação *JAK2*V617F. Das 180 análises realizadas com suspeita clínica de NMPCs, 21,3% (30/141) foram positivas para a mutação *JAK2*V617F e 23,1 (9/39) para a mutação *BCR/ABL1*. Sendo, dessa forma, importante para a conclusão do diagnóstico clínico/laboratorial dos pacientes portadores de NMPCs.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos como critérios de inclusão, neste estudo de coorte, amostras consecutivas de pacientes com suspeita clínica de NMPCs, encaminhados pelo HCPE e HEMOPE. Para realização dos exames foram colhidos cerca de 8 mL de sangue periférico utilizando o EDTA como anticoagulante para consequente extração do ácido desoxirribonucleico(DNA) e do Ácido Ribonucleico (RNA). A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (Davis et al., 1986), enquanto a extração de RNA total foi executada utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitogen, EUA). A identificação da mutação *JAK2*V617F foi realizada através da técnica PCR-RFLP e após verificação da amplificação dos fragmentos, os produtos foram submetidos à reação de digestão pela enzima de restrição *Bsa*XI (Baxter et al, 2005) e visualizado a partir da eletroforese em gel de agarose. A detecção da translocação t(9;22)(q34;q11)-*BCR/ABL1* isoforma p210 foi realizada através da técnica de *Nested PCR*, minimamente modificada da metodologia proposta por Dongen, 1999. Tendo os RNAs totais transcritas a cDNA utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®, USA). O fragmento amplificado a partir da translocação t(9;22)(q34;q11)-*BCR/ABL1* isoforma p210 foi analisado por eletroforese em gel de agarose. Foi realizada uma reação de controle interno, para verificação da transcrição do RNA, utilizando *primers* da  $\beta$ -actina, para cDNA.

### RESULTADOS

Durante o período de agosto 2014 a julho de 2015 foram executadas a padronização e realização das técnicas para pesquisa do gene de fusão *BCR/ABL1* e mutação *JAK2*V617F, no Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial do LabCen/CCB-UFPE. Durante esse período foram realizadas um total de 180 análises de pacientes com suspeita clínica de NMPCs, das quais 141 foram encaminhados para realização da pesquisa da mutação *JAK2*V617F e 39 para avaliação do gene de fusão *BCR/ABL1* isoforma p210.

Das 141 amostras analisadas para a pesquisa da mutação *JAK2V617F* 12,8% (18/141) foram heterozigotos (carga alélica intermediária), 8,5% (12/141) homozigotos (Carga alélica alta) e 78,7% (111/141) selvagem. Quanto a detecção da mutação do gene de fusão *BCR/ABL1*, das 39 análises realizadas 76%(30/39) foram negativas e 23,1%(9/39) positivas para a mutação. Durante a pesquisa das mutações do gene de fusão *BCR/ABL1 p210* e *JAK2 V617F*, tivemos um paciente diagnosticado como positivo e homozigoto, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Dentre as 141 amostras recebidas para pesquisa da *JAK2 V617F*, foram detectados 30 indivíduos mutados para *JAK2V617F*. Isto corresponde a uma porcentagem de 21,3% dentre nosso *n* amostral. Um estudo realizado por DA Silva et.al (2012) analisou a mutação *JAK2V617F* em 144 pacientes previamente diagnósticos com NMPC Ph-negativo segundo critérios da OMS, e encontrou uma porcentagem de aproximadamente 64,6% (93/144) de positividade para a mutação *JAK2V617F* independente da carga alélica da mutação. Nosso estudo mostra uma positividade em cerca de 1/3 em relação ao estudo supracitado, entretanto, o trabalho realizado por DA Silva et.al (2012) teve como base pacientes previamente diagnósticos com PV, TE e MPF, aumentado assim as chances de positividade para a mutação *JAK2V617F*. Enquanto nosso estudo, por se tratar de um trabalho de triagem, as chances de obter positividade é inferior, pois lidamos com pacientes não diagnosticados ainda com NMPCs, mas sim de pacientes com suspeita clínica. Diante a pesquisa da mutação do gene de fusão *BCR/ABL1*, a alta frequência obtida em amostra é justificada pela excelente triagem realizada para a detecção da mutação, pois como citado no estudo de Jabbour et al (2014) por ter características clínico-laboratorial mais específicas, a fase crônica é mais comum para o diagnóstico da LMC, onde o paciente cursa com anemia, esplenomegalia, fadiga e a nível do sangue periférico leucocitose, desvio a esquerda escalonado, basofília e presença de células blásticas inferior a 10%, diferentemente do que ocorre nos casos de NMPC Ph-negativo que podem apresentar características clínico-laboratoriais pouco específicas. O paciente diagnosticado com ambas as mutações, Inicialmente foi diagnosticado como heterozigoto para a mutação *JAK2V617F*, sendo a homozigose posteriormente encontrada após evolução clonal, além de reportar positividade para o gene de fusão *BCR/ABL*, corroborando com os achados de Bornhauser M. et.al (2007) e Osamu Yamada et.al (2014). Contudo, a obtenção da translocação do gene de fusão *BCR-ABL*, pode ter sido um acontecimento molecular independente da mutação *JAK2V617F* ou um evento secundário a um clone contendo a mutação *JAK2V617F* (Osamu Yamada et.al 2014).

## CONCLUSÕES

Concluimos que o diagnóstico molecular para os pacientes com suspeita clínica de Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas, realizado a partir das pesquisas para a translocação t(9;22)(q34.1;q11.2), que resulta no gene híbrido *BCR-ABL*, e para a mutação *JAK2V617F*, atendidos no setor de Hematologia do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, além de proporcionar um treinamento técnico para a padronização e realização das técnicas de pesquisa das mutações acima citadas, também possibilitou o conhecimento à cerca do perfil molecular destas entidades patológicas, além da realização do diagnóstico precoce, que permitirá um melhor acompanhamento e tratamento destes pacientes.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer ao CNPq, por ter possibilitado e financiado esta pesquisa, ao setor de Hematologia da UFPE por ter possibilitado a realização técnica, aos meus orientadores e a todos que compõem o grupo de Hematologia da UFPE por terem contribuído com todo conhecimento necessário para o desenvolvimento da pesquisa

### REFERÊNCIAS

Baxter,E.J., Scott,L.M., Campbell,P.J., East,C., Fourouclas,N., Swanton,S., Vassiliou,G.S., Bench,A.J., Boyd,E.M., Curtin,N., Scott,M.A., Erber,W.N., & Green,A.R. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 365, 1054-1061

Bornhauser M, Mohr B, Oelschlaegel U, et al: Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia* 21:1824-1826, 2007.

Chen E and Mullally A (2011) How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms ? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 268–276.

DA SILVA, Rafael Ramos et al. JAK2 V617F mutation prevalence in myeloproliferative neoplasms in Pernambuco, Brazil. *Genetic testing and molecular biomarkers*, v. 16, n. 7, p. 802-805, 2012.

Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*. 2014;89(5):547–556.

Kralovics,R., Passamonti,F., Buser,A.S., Teo,S.S., Tiedt,R., Passweg,J.R., Tichelli,A., Cazzola,M., & Skoda,R.C. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N.Engl.J.Med.*, 352, 1779-1790.

Milosevic,J.D. & Kralovics,R. (2013) Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int.J.Hematol.*, 97, 183-197.

Osamu Yamada, Emna Mahfoudhi, Isabelle PLO, Kohji Ozaki, Mayuka Nakatake, Masaharu Akiyama, Hisashi Yamada, Kiyotaka Kawauchi, and William Vainchenker. Emergence of a BCR-ABL Translocation in a Patient With the JAK2V617F Mutation: Evidence for Secondary Acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F Clone. *JCO* Jul 20, 2014:e76-e79; published online on February 10, 2014;

Vardiman,J.W., Thiele,J., Arber,D.A., Brunning,R.D., Borowitz,M.J., Porwit,A., Harris,N.L., Le Beau,M.M., Hellstrom-Lindberg,E., Tefferi,A., & Bloomfield,C.D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114, 937-951