



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**CECÍLIA BEATRIZ ALVES AMARAL**

***POLICITEMIA VERA - CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E  
MOLECULAR E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS***

**[ARTIGO DE REVISÃO]**

**ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
[PROF.<sup>a</sup> DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO]  
[PROF. DOUTOR JOSÉ MANUEL NASCIMENTO COSTA]**

**[SETEMBRO/2009]**

**POLICITEMIA VERA - CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR E NOVAS  
ABORDAGENS TERAPÊUTICAS**

«cyanosis with persistent Hyperglobulie»

*Vaquez 1892*

## Índice

<u>I.RESUMO</u> .....	v
<u>II.ABSTRACT</u> .....	vii
<u>1.INTRODUÇÃO</u> .....	2
<u>2. EPIDEMIOLOGIA</u> .....	7
<u>3. CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELÓIDES</u> .....	8
<u>4. ETIOLOGIA</u> .....	15
<u>5. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO</u> .....	15
<u>6. BASES GENÉTICAS E MOLECULARES</u> .....	18
<u>6.1. JAK2 e a mutação V617F</u> .....	30
<u>6.1.1. Estrutura do gene e da proteína JAK</u> .....	36
<u>6.1.2. A Mutação JAK2V617F</u> .....	38
<u>6.2. Vias de Sinalização celular</u> .....	42
<u>6.3. Mutação JAK2 e complicações da PV</u> .....	47
<u>7. DIAGNÓSTICO</u> .....	47
<u>7.1.Características Clínicas</u> .....	47
<u>7.2.Diagnóstico Laboratorial</u> .....	53
<u>8. TRATAMENTO</u> .....	60
<u>8.1. Prevenção dos problemas vasculares na PV</u> .....	65
<u>8.1.1. Flebotomia</u> .....	65
<u>8.1.2 .Antiagregantes plaquetares</u> .....	66
<u>8.1.3.Mielossuppressores</u> .....	67
<u>8.2. Tratamento Paliativo</u> .....	71
<u>8.3. Transplante de medula</u> .....	72

<u>8.4. Novos fármacos dirigidos a alvos moleculares – Os inibidores das tirosina cinases</u> .....	73
<u>9. EVOLUÇÃO DA DOENÇA</u> .....	75
<u>10. CONCLUSÕES</u> .....	78
<u>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	80

## I. RESUMO

A Policitemia Vera (PV) é uma doença clonal de etiologia desconhecida, na maior parte dos casos, que envolve a célula estaminal progenitora hematopoiética multipotencial. É uma neoplasia mieloproliferativa crónica (NMP) que se caracteriza pela expansão das três linhas celulares hematopoiéticas: eritróide, granulocítica e megacariocítica, com predomínio da primeira, de modo independente dos mecanismos normais de regulação da eritropoiese. Além disso, as células têm aspecto morfológico normal, a fibrose medular é pouco significativa e os níveis de eritropoietina (Epo) são habitualmente normais a baixos. Além da hiperplasticidade medular com sobreprodução de uma ou de todas as linhas celulares, a doença cursa com hematopoiese extramedular, hiperviscosidade, propensão para complicações como trombose ou hemorragia e risco de desenvolvimento de mielofibrose ou transformação em leucemia aguda.

A descrição relativamente recente da associação de uma mutação no gene JAK2, localizado no cromosoma 9p24, com as doenças mieloproliferativas clássicas negativas para BCR-ABL, como a PV, veio permitir avanços significativos na compreensão da patofisiologia deste grupo de doenças hematológicas. A mutação provoca uma alteração do aminoácido V (valina) para F (fenilalanina) na posição 617 (JAK2V617F). De acordo com os dados publicados, a frequência da detecção da mutação JAK2V617F em doentes com PV é de cerca de 95%.

A proteína JAK2 é uma tirosina cinase citoplasmática, que se encontra associada ao domínio intracelular dos receptores de citocinas (como a Epo e trombopoietina - Tpo), e de factores de crescimento, essenciais para a função destes receptores. A mutação da JAK2 conduz à activação constitutiva dos receptores, independente da ligação à respectiva citocina

e/ou hipersensibilidade a factores de crescimento, com consequente activação de múltiplas vias de sinalização intracelulares como a JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transductor and activator of transcription), a PI3K (fosfatidilinositol 3 cinase) e a MAPK (proteína cinase activadora de mitose), envolvidas na transformação e proliferação dos progenitores hematopoiéticos. Por outro lado, as células evidenciam alteração na diferenciação terminal e resistência à apoptose *in vitro* que poderá estar relacionada com o aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-XL.

Além dos avanços no diagnóstico, a detecção da mutação JAK2V617F tem contribuído para melhorar a classificação e a terapêutica dos doentes com PV. Deste modo, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na PV tem levado os investigadores à descoberta de novos fármacos dirigidos ao defeito molecular, permitindo novas abordagens terapêuticas mais eficazes e provavelmente de menor toxicidade.

Este trabalho procura fazer uma revisão sobre o actual conhecimento da caracterização molecular e clínica da PV e quais as suas implicações no diagnóstico e abordagem terapêutica desta NMP.

**Palavras Chave: Policitemia vera, JAK2, JAK2V617F, via JAK-STAT, Neoplasias mieloproliferativas**

## II. ABSTRACT

Polycythemia Vera (PV) is a clonal disease of unknown etiology, which often involves the pluripotential hematopoietic stem cell. This disease integrates the family of chronic

myeloproliferative neoplasm (MPN) and is characterized by the growth of the three hematopoietic cellular lineages: granulocytic, megakaryocytic and erythroid, with predominance of the last one and regardless the normal mechanisms of erythropoiesis regulation. Moreover, cells have normal morphological aspect, bone marrow shows slight fibrosis and the levels of erythropoietin (Epo) usually vary from normal to low. Besides marrow hypercellularity with overproduction of one or all the cellular lineages, the disease courses with extramedullary hematopoiesis, hyperviscosity, leading to complications such as thrombosis or bleeding and risk of transformation to myelofibrosis or acute leukemia.

Recently it has been described the association between the mutation in the JAK2 gene, located on chromosome 9p24, with the classic myeloproliferative disorders BCR-ABL negative, such as PV, which has brought significant advances in the understanding of the pathophysiology of this group of hematologic malignancies. The mutation causes a change of amino acid V (valine) to F (phenylalanine) at position 617 (JAK2V617F). According to published data, the frequency of JAK2V617F mutation detected in patients with PV is about 95%.

JAK2 protein is a cytoplasmic tyrosine kinase, which is associated to the intracellular domain of cytokine receptors, such as Epo and thrombopoietin (Tpo), and growth factors which are essential to the function of these receptors. JAK2 mutation leads to the constitutive receptors activation, independent of connection to their cytokine and / or hypersensitivity to growth factors, with consequent activation of multiple intracellular signaling pathways such as JAK / STAT (Janus Kinase / Signal transducer and transcription activator), the PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) and MAPK (Mitogen-activated protein), involved in the transformation and proliferation of hematopoietic progenitors. Moreover, the cells show

changes in terminal differentiation and resistance to in vitro apoptosis which is possibly related to the increasing expression of anti-apoptotic protein Bcl-XL.

In addition to the advances in diagnosis, detection of JAK2V617F mutation has contributed to the improvement of classification and treatment in patients with PV. Thus, knowledge of the molecular mechanisms involved in PV has led investigators to the discovery of new drugs targeting molecular defects, allowing new therapeutic approach more efficient and probably less toxic.

The aim of this article is to review the current knowledge of clinical and molecular characterization of PV, and its implications on the diagnosis and therapeutic approach of this myeloproliferative disorder.

**Key Words: Polycythemia Vera; JAK2; JAK2V617F; JAK-STAT pathway; Myeloproliferative Neoplasms**



**Abreviaturas:**

CPH – Célula Progenitora Hematopoietica

DMPC- Doenças Mieloproliferativas Crónicas

DSM – Doença Sistémica dos Mastócitos

Epo – Eritropoietina

ET – Trombocitémia Essencial

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LNC – Leucemia Neutrófila Crónica

MAPK – Proteína Cinase Activadora de Mitose

MFP – Mielofibrose Primária

MO – Medula Óssea

NMP – Neoplasias Mieloproliferativas

PDGFR – Receptor do Factor de Crescimento Derivado de Plaquetas

PI3K – Fosfatidilinositol 3 fosfato

PTK – Proteína Tirosina Cinase

PV – Policitemia Vera

PVSG – Polycythemia Vera Study Group

SHE – Síndrome Hipereosinofílica

SOCS – Supressores da Sinalização das Citocinas

Sp – Sangue periférico

STAT – Transdutor de Sinal e Activador de Transcrição

## 1. INTRODUÇÃO

A Policitemia Vera (PV) é uma doença clonal adquirida, com origem na célula progenitora hematopoiética. É considerada uma Neoplasia Mieloproliferativa (NMP), uma vez que partilha, além de uma origem comum, algumas características clínicas e biológicas com as restantes NMP, como a trombocitémia essencial (TE), a mielofibrose primária (MFP), a leucemia mielóide crónica (LMC), alguns subtipos da síndrome hipereosinofílica (SHE), a doença sistémica dos mastócitos (DSM) e outras doenças raras (James C, 2008; Vardiman J W *et al.*,2008).

Algumas destas doenças haviam sido descritas há mais de 50 anos, mas foi William Dameshek em 1951 quem sugeriu a sua inter-relação clínica. Posteriormente, com o desenvolvimento de métodos baseados na inactivação do cromossoma X (nas mulheres) provou-se efectivamente a origem clonal das células nas NMP. Estas observações por sua vez alimentaram uma procura exaustiva de mutações somáticas adquiridas implicadas na patogénese da doença. Em 2005 provou-se que a PV, a TE e a MFP seriam causadas, na maioria dos casos, por mutações que activavam constitutivamente a tirosina cinase JAK2. O estudo aprofundado destas mutações começou a abrir novos horizontes sobre os mecanismos moleculares da doença, assim como da complexa interacção entre genótipo e fenótipo, permitindo observar o facto de uma simples mutação contribuir para 3 fenótipos distintos (Levine R *et al.*, 2008). Assim, em 50 anos, a evolução tem sido notável, desde a descrição clínica das doenças, passando pela descoberta e caracterização dos genes envolvidos até às novas terapêuticas dirigidas a alvos moleculares.

A PV foi descrita pela primeira vez em 1892, por Louis Henri Vaquez, num doente com eritrocitose marcada e hepatoesplenomegalia que considerou ser resultado de

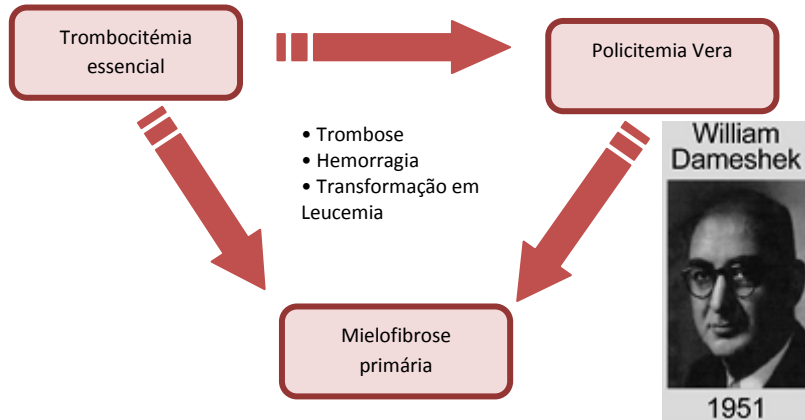
proliferação celular hematopoiética. Subsequentemente, William Osler descreveu um conjunto de doentes com eritrocitose e esplenomegalia, que ele classificou como “doença de Vasquez”.

Mais tarde, Gustav Hueck, físico alemão, descreve e caracteriza a mielofibrose pela presença de fibrose da medula óssea (MO) e hematopoiese extramedular em doentes com MFP. Em 1934, Emil Epstein e Alfred Goedel, descrevem doentes com trombocitose sem eritrocitose marcadas como fazendo parte de uma síndrome clínica distinta, a TE.

Embora as diferentes NMP já tivessem sido reconhecidas como entidades clínicas distintas, William Dameshek, foi o primeiro a reconhecer que estas entidades deveriam ser classificadas como um grupo de “Doenças Mieloproliferativas” fenotipicamente relacionadas. Ele observou que, embora a eritrocitose fosse característica da PV, muitos doentes com esta doença apresentavam “pancitose” com proliferação das linhagens eritróide, megacariócítica e granulocítica e que, frequentemente, desenvolviam fibrose da MO, apresentavam um esfregaço de sangue periférico (Sp) leucoeritoblástico e esplenomegalia. Dadas as dificuldades na distinção entre PV, MFP e outras NMP, Dameshek considerou estas doenças “intimamente relacionadas”, caracterizadas por uma proliferação, “possivelmente devido a um estímulo desconhecido”.

Embora a nomenclatura e definições das diferentes NMP tenha mudado nas últimas décadas, Dameshek deu um forte contributo ao utilizar a observação clínica como ponto de partida para a primeira classificação das NMP clássicas (figura 1) (Levine R *et al.*, 2008). Em 1951, Dameshek classificou a PV como uma doença mieloproliferativa crónica (DMPC), juntamente com outras doenças mielóides relacionadas que incluíam a leucemia mielóide

crónica (LMC), a TE e a MFP, devido às similaridades clínicas e laboratoriais que estas doenças apresentavam.



**Figura 1. Doenças mieloproliferativas clássicas cromossoma Philadelphia negativas.** Classificação de William Dameshek de 1951. (Adaptado de Levine and Gililand, 2008)

Antes da PV ser formalmente descrita por Vaquez em 1892 e posteriormente por Osler em 1903, o fenótipo clínico (plétora e veias engorgitadas) já havia sido observado. Em 1910, era evidente que a eritrocitose na PV estava frequentemente associada a leucocitose, trombocitose e hiperplasia panmielóide da MO. O desenvolvimento de mielofibrose e leucemia aguda, como parte da história natural da PV, foram referenciados pela primeira vez em 1935 e 1938, respectivamente.

Discordante com o tradicional esquema proposto por Dameshek, o sistema de classificação até há cerca de 1 ano atrás considerava a LMC separada das outras NMPs crónicas, não só por causa da sua associação específica e bem documentada com o cromossoma Philadelphia (translocação 9;22; gene de fusão *BCR-ABL* com actividade tirosina cinase), a única anomalia genética detectada até então, mas também pela resposta ao tratamento com interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) e mesilato de imatinib. O grupo das NMP esteve então restrito à PV, TE e MFP durante anos.

Com os recentes avanços na área da biologia molecular, a nova classificação da OMS veio adicionar ao grupo das NMP crónicas clássicas, doenças como: Leucemia Mielóide Crónica (LMC) novamente, Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC), Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC), Doença Sistémica dos Mastócitos (DSM) e as NMP crónicas não classificáveis noutras doenças (Tabela 1) (Helmann A, 2008; Vardiman J W *et al.*,2008; Keersmaecker e Cools,2006; Schafer A,2006).

**Tabela 1. As Neoplasias Mieloproliferativas**

Policitemia Vera (PV)
Trombocitemia Essencial (TE)
Mielofibrose Primária (MFP)
Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC)
Leucemia Mielóide Crónica, BCR-ABL1 positiva (LMC)
Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC)
Doença Sistémica dos Mastócitos (DSM)
Neoplasias Mieloproliferativas, não classificáveis noutro grupo (NMP, NC)

*(Adaptado de Swerdlow SH et al.,2008)*

As 3 NMPs crónicas clássicas BCR-ABL negativas são caracterizadas por variáveis graus de hiperplasia da MO e hiperplasia megacariocítica atípica. Além disso, qualquer uma das três pode cursar com esplenomegalia, leucocitose, trombocitose, e anomalias citogenéticas. A distinção clínica entre estas NMP faz-se pela demonstração de eritrocitose clonal na PV, fibrose da medula óssea substancial na MFP, e trombocitose clonal que não está associado nem com eritrocitose nem com alto grau de mielofibrose na TE.

Actualmente, a descoberta de mutações activadoras do gene que codifica a proteína JAK2 têm revolucionado a abordagem diagnóstica das NMP, em especial das crónicas clássicas BCR-ABL negativas, diagnóstico esse que, até então, era feito com base em dados

clínicos e laboratoriais e achados histológicos da MO (Swerdlow SH *et al.*,2008; Tefferi A, 2003). No entanto, a detecção das mutações do gene JAK2 nas NMP não é responsável por nenhum fenótipo clínico ou morfológico em particular e foram em alguns casos encontradas também na Síndrome Mielodisplásica (SMD), SMD/NMP e Leucemia Mielóide Aguda (LMA), faladas posteriormente (Swerdlow SH *et al.*,2008). Apesar disso, a mutação JAK2V617F é encontrada em quase todos os doentes com PV e em aproximadamente metade daqueles com TE e MFP. Nos poucos doentes com PV que não apresentam esta mutação, pode ser detectada uma mutação activadora no exão 12 também do gene JAK2 e numa pequena proporção de casos de MFP e TE é observada uma mutação activadora do gene MPL W515L ou W515K. (Swerdlow SH *et al.*,2008).

De salientar que, na PV, as células progenitoras hematopoiéticas normais podem co-existir com células anómalas (clonais) (Tefferi A, 2003) e que a proliferação celular pode ocorrer em apenas uma ou nas três linhagens (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) em simultâneo (Haferlach T *et al.*,2008; Delhommeau F *et al.*,2006; Tefferi A, 2003). No entanto, a PV caracteriza-se por uma eritropoiese anormal, em que muitos progenitores eritróides são hipersensíveis e independentes da eritropoietina (Epo), mas as células formadas mantêm morfologia e fisiologia normais (Barbui e Finazzi, 2007).

Com o conhecimento dos mecanismos moleculares, o tratamento deste tipo de neoplasias tem sofrido alterações ao longo do tempo. A primeira forma de tratamento foi a flebotomia recomendada por Osler na primeira década do século 20. Durante este período inicial, a irradiação do baço, ossos longos e vértebras também era utilizada no tratamento da PV e foi utilizada até a introdução da terapia intravenosa com fósforo radioativo 32 (<sup>32</sup>P) por Lawrence em 1938. Até o início dos anos 50, os agentes alquilantes e antimetabolitos foram introduzidos no arsenal terapêutico da PV, e aparentavam benefícios na redução de

complicações trombóticas. No entanto, o verdadeiro efeito sobre as complicações trombóticas e o potencial leucemogénico dos fármacos mielossupressores permaneceram incertos.

Estes e outros factores levaram à formação de um grupo internacional para estudo da PV, o *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG), em 1967, sob os auspícios do Instituto Nacional do Cancro, cujos objectivos incluíam descrever a história natural da PV e definir o tratamento ideal recorrendo a ensaios terapêuticos de longo prazo.

Como vimos, o diagnóstico e tratamento das NMP BCR-ABL negativas são actuais alvos de investigação científica. A descoberta em 2005 da mutação activadora das tirosina-quinases, a mutação JAK2V617F, assim como de alterações moleculares adicionais relevantes (mutações do exão 12 da JAK2 e Mpl) têm enriquecido o entendimento da patogénese das NMP, podendo contribuir para novas abordagens terapêuticas neste tipo de patologias.

## **2. EPIDEMIOLOGIA**

As NMP são patologias essencialmente do adulto (50-70 anos), estando entre as neoplasias hematológicas mais frequentes (Vannucchi A *et al.*,2009), com uma incidência de 6 a 10 casos/100.000pessoas/ano (Vardiman JW *et al.*,2008) com a PV a incidir em aproximadamente 2casos/100.000pessoas (Spivak J.,2008) .

Apesar de poder surgir em qualquer idade (Swerdlow SH *et al.*,2008; Teofili L *et al.*, 2007), a incidência aumenta com a idade, sendo a média de aparecimento aos 60 anos. No entanto, aproximadamente 7% dos doentes são diagnosticados antes dos 40 anos e apenas 0,1%, antes dos 20 anos (Teofili L, 2007; Tefferi A, 2003). Existe uma leve preponderância

no sexo masculino, com um ratio 1,2:1 (H:M) (Tefferi A, 2003), mas paradoxalmente, há um predomínio do sexo feminino no limite da idade reprodutiva (Spivak J, 2008).

A PV, bem como a TE, são consideradas doenças relativamente indolentes (Vannucchi A *et al.*,2009), com esperança média de vida que excede os 10-15 anos. Contudo, em doentes não tratados, a esperança média de vida diminui para 6 a 18 meses (Barbui e Finazzi, 2007; Stuart B *et al.*,2004; Passamonti F *et al.*,2000; Rozman C *et al.*,1991). Por outro lado, a mortalidade global de doentes tratados com vários regimes de tratamento, foi estimada em 3,5 mortes/100 pessoas/ano, ou seja, quase o dobro do risco da população geral (Squizzato A *et al.*,2008).

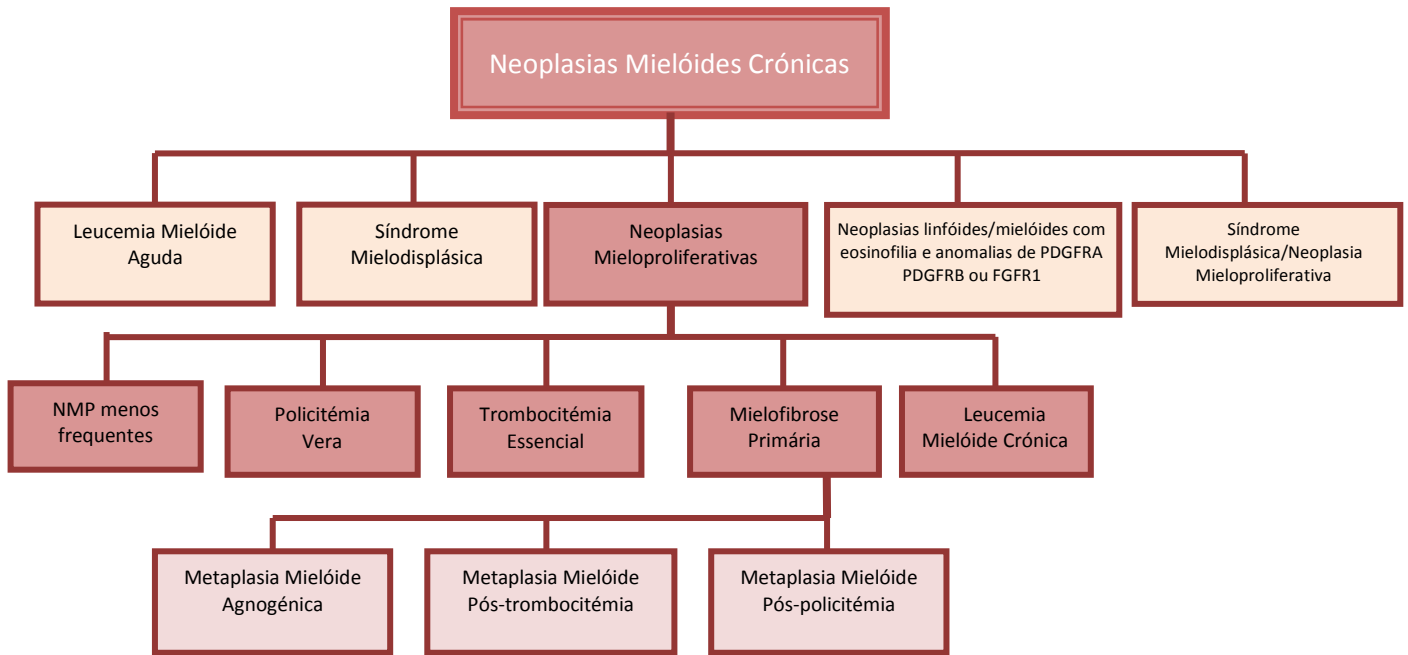
A diminuição da sobrevida está relacionada com complicações trombo-hemorrágicas, mais frequentes em idades superiores a 60 anos, e com a transformação em MFP e LMA, que continuam a representar as maiores causas de morte. Em 10-20% dos casos, a PV evolui para uma fase de aceleração, e/ou MFP para os quais contribuem alguns mielossuppressores (Schafer A, 2006; Steensma e Tefferi, 2003). Segundo um ensaio randomizado da PVSG-01, a incidência de LMA em doentes tratados exclusivamente com flebotomia ronda os 1,5%, existindo uma correlação entre a idade e o aumento do risco de leucemia (Schafer A, 2006).

### **3. CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELÓIDES**

A classificação diagnóstica das chamadas doenças mieloproliferativas baseava-se na «mieloproliferação» característica associada a maturação relativamente normal e tendência para hematopoiese extramedular. Contudo, estas características são mais aparentes do que



reais porque, no que respeita às células progenitoras hematopoiéticas envolvidas, as NMP clássicas (PV, TE e MFI) são mais doenças de «mieloacumulação» do que de «mieloproliferação» (Spivak e Silver, 2008).



**Figura 2. Classificação das doenças mielóides crónicas.** As doenças mielóides crónicas dividem-se em cinco grupos: Leucemia mielóide aguda, Síndrome mielodisplásica, Neoplasias mieloproliferativas, doenças com características de ambos subgrupos Neoplasia mieloproliferativas e Síndrome mielodisplásico, e mais recentemente neoplasias mielóides e linfóides com eosinofilia e anomalias de PDGFRA PDGFRB ou FGFR1. Dentro das Neoplasias Mieloproliferativas, temos as clássicas (PV, TE, MFP e a LMC) e as menos comuns que incluem a Leucemia Neutrófila Crónica (LNC), a Leucemia Eosinófila Crónica (LEC), a Doença Sistémica dos mastócitos (DSM) e as NMP crónicas não classificáveis noutra parte. (Adaptado de Swerdlow SH et al., 2008; Tefferi A., 2003).

A actual classificação da OMS das neoplasias mielóides baseia-se na determinação, antes do início da terapêutica, das características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas das células neoplásicas, para estabelecimento da linhagem e grau de maturação, e para decidir se a proliferação celular é normal e eficaz ou displásica e ineficaz. A percentagem de blastos no Sp e na MO, continua a ser de importância prática para a categorização das neoplasias mielóides e para prever a sua progressão. Além disso, as

alterações citogenéticas (cariótipo) e genéticas são importantes para a caracterização e prognóstico destas neoplasias (Swedlow SH *et al.*, 2008).

Os avanços na compreensão da patogénese molecular das NMP clássicas BCR-ABL negativas deram o argumento irrefutável de que nestas doenças ocorrem mutações carcinogénicas. Com a revisão dos critérios de diagnóstico da OMS em 2008 o termo “Síndromas/Doenças Mieloproliferativas” proposto por Dameshek, foi substituído por “Neoplasias Mieloproliferativas” (Vannucchi A *et al.*, 2009; Kota J *et al.*, 2008; Vardiman J W *et al.*, 2008).

Assim, como mencionado, na actual reclassificação da OMS, existem cinco grupos de neoplasias mielóides (*figura 2*): a leucemia mielóide aguda (LMA); as síndromes mielodisplásicas (SMD) e seus subtipos; as Neoplasias Mieloproliferativas (NMP); uma categoria que sobrepõe síndromes mielodisplásicas/neoplasias mieloproliferativas (SMD/NMP); e as neoplasias mielodisplásicas associados à eosinofilia e anomalias moleculares específicas (Tabela 2) (Vannucchi A *et al.*, 2009; Haferlach T *et al.*, 2008).

As **NMP** são doenças clonais da célula estaminal hematopoiética (Levine e Gilliland, 2008; Vardiman JW *et al.*, 2008; Schafer A, 2006; Kaushansky K, 2005; Steensma e Tefferi, 2003) que resultam da desregulação da transdução de sinal, como consequência de mutações somáticas adquiridas (Tefferi e Gilliland, 2007) geralmente em genes que codificam proteínas com actividade de tirosina cinase (TK) (*Figura 3*) (Vardiman JW *et al.*, 2008).

**Tabela 2. Neoplasias Mielóides: subgrupos principais e características frequentes ao diagnóstico.**

Doença	Celularidade da medula	% de blastos da medula	Maturação	Morfologia	Hematopoiese	Contagem de células do sangue	Organo-megalias
<b>NMP</b>	Geralmente aumentada, frequentemente normal na ET	Normal ou levemente aumentados; <10% na fase crónica	Presente	Granulócitos e receptores eritróides normais; megacariócitos anormais	Eficaz	Variável; uma ou mais linhagens mielóides geralmente inicialmente aumentadas	Frequentes
<b>Neoplasias linfóides/ mielóides com eosinofilia e anomalias de PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1</b>	Aumentada	Normal ou levemente aumentados; <10% na fase crónica	Presente	Relativamente normal	Eficaz	Eosinofilia	Comum
<b>SMD</b>	Aumentada; ocasionalmente normocelular ou hipocelular	Normal ou aumentada; <20%	Presente	Displasia de uma ou mais linhagens mielóides	Ineficaz	Citopenia(s)	Pouco comum
<b>SMD/NMP</b>	Aumentada	Normal ou levemente aumentada; <20%	Presente	Frequentemente uma ou mais linhagens displásicas; a LMMJ frequentemente e apresenta displasia mínima	Pode variar entre as linhagens	Variável; é comum o aumento da contagem leucocitária	Comum
<b>LMA</b>	Normalmente aumentada	Aumentada; $\geq 20\%$ , excepto em casos com anomalias citogenéticas específicas ou em alguns casos de eritroleucemia	Varia, geralmente residual	Pode ou não ser associada a displasia de uma ou mais linhagens	Eficaz ou ineficaz	Contagem leucocitária variável; normalmente e anemia e trombocitopenia	Pouco comum

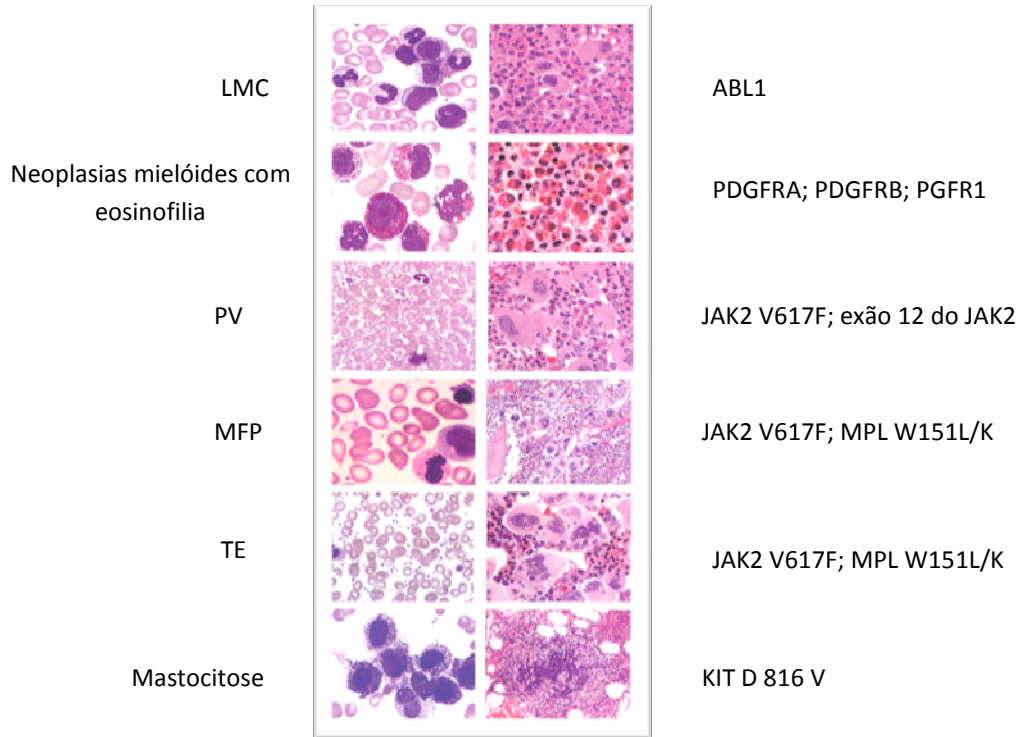
(Adaptado de Swerdlow SH *et al.*,2008)

Caracterizam-se por hiperplasia medular com maturação hematopoiética (Vardiman JW *et al.*,2008), aumento de uma ou mais linhagens mielóides no Sp (Helmann A, 2008, Vardiman JW *et al.*,2008; Haferlach T *et al.*,2008; Delhommeau F *et al.*,2006; Tefferi A, 2003), hepato e esplenomegália e propensão para hemorragias e trombose (Spivak e Silver, 2008). Normalmente, o progenitor celular alterado assume dominância sobre os progenitores não transformados (James C, 2008; Sillero e Cañete, 2007; Skoda R, 2007) e é hipersensível à estimulação por factores de crescimento fisiológicos como a Trombopoietina (Tpo) e a Eritropoietina (Epo) (Barbui e Finazzi, 2007). São normalmente patologias de início insidioso e evolução lenta, por etapas, durante as quais se podem transformar umas nas outras (Vardiman JW *et al.*,2008), e evoluir para falência medular com mielofibrose e hematopoiese ineficaz ou transformação blástica com desenvolvimento de Leucemia Aguda (Schafer A, 2006). Se existir 10 a 19% de blastos no Sp ou MO a doença está em fase de aceleração, mas se os blastos forem superiores a 20% a doença está em fase blástica (Vardiman JW *et al.*,2008).

A primeira entidade a diferenciar-se das restantes foi a LMC, com a descoberta da translocação associada, a t(9;22)(q34;q11), revelada pela presença do cromossoma philadelphia (Ph). A presença recorrente desta anomalia cromossómica levou à descoberta do primeiro oncogene produzido pelo gene de fusão BCR/ABL (Delhommeau F *et al.*,2006) que codifica uma proteína com actividade de tirosina cinase alterada.

Posteriormente, foram identificadas mais alterações moleculares responsáveis pela função anómala de outras proteínas tirosina cinases (PTKs), nomeadamente mutações nos genes que codificam as cinases Janus (JAK) e que contribuem para a patogénese da PV, TE e MFP. Além disso, identificaram-se rearranjos em genes que codificam os receptores PTK dos factores de crescimento derivado das plaquetas alfa e beta (PDGFRA, PDGFRB) ou do factor

de crescimento dos fibroblastos (FGFR1), em doentes com neoplasias mielóides associadas a eosinofilia. Também a mastocitose sistémica, quase sempre associada à mutação D816V no gene c-KIT que codifica um receptor PTK, apresenta similaridades clínicas com outras NMP, sendo incluída neste grupo (Figura 3) (Swerdlow SH *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Neoplasias mieloproliferativas (NMP) e outras neoplasias mielóides associadas a mutação/rearranjo dos genes tirosina cinase. (Adaptado de Vardiman J W *et al.*, 2008)

Na tabela 3 estão representadas as Neoplasias mieloproliferativas/Síndromes mielodisplásicas, que incluem neoplasias mielóides clonais que na apresentação inicial tem algumas características clínicas, laboratoriais ou morfológicas que suportam um diagnóstico de SMD e outras características mais consistentes com NMP (Vannucchi A *et al.*,2009; Haferlash T *et al.*,2008). Caracterizam-se frequentemente por hiper celularidade da MO devido a proliferação de uma ou mais linhagens mielóides. Apesar da proliferação poder ser

eficaz em algumas linhagens, com aumento do número de células circulantes morfológica ou funcionalmente displásicas, esta pode ser ineficaz resultando em citopenias periféricas. No entanto, a percentagem de blastos na MO e Sp é sempre inferior a 20% (Swerdlow SH *et al.*,2008; Vannucchi A *et al.*,2009).

A base molecular destas doenças é ainda desconhecida, embora neste grupo de doenças tenham sido identificadas várias alterações na via de sinalização RAS/MAPK, em consequência de mutações dos genes N-RAS, K-RAS, PTNPN11 e NF-1 e, menos frequentemente, a mutação JAK2V617F (Vardinan *et al.*,2008; Vannucchi A *et al.*,2009).

A inclusão neste grupo da Anemia Refractária com Sideroblastos em Anel e Trombocitose é controversa uma vez que, em cerca de 50-60% dos casos estudados, os doentes eram portadores da mutação JAK2V617F (Swerdlow SH *et al.*, 2008).

**Tabela 3. Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP)**

Leucemia Crónica Mielomonocítica (LCMM)
Leucemia Mielóide Crónica Atípica, BCR-ABL negativa (LMCa)
Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ)
Neoplasmas Mielodisplásicos/Mieloproliferativos não classificáveis (SMD/MPN, NC)
Anemia Refractária com Sideroblastos em Anel e Trombocitose (provisoriamente)

(Adaptado de Swerdlow SH *et al.*, 2008)

A evolução destas doenças para **Leucemia mielóide aguda (LMA)** resulta da expansão clonal de mieloblastos na MO, Sp ou outros tecidos, podendo atingir uma ou todas as linhagens mielóides. Para o diagnóstico de LMA a percentagem de blastos é superior a 20% no Sp ou na MO sendo necessária a pesquisa de certas anomalias genéticas específicas. (Vannucchi A *et al.*, 2009; Swerdlow *et al.*,2008).

## **4. ETIOLOGIA**

Como referido, a PV foi a primeira das NMP a ser reconhecida como uma entidade clínica distinta (Skoda R, 2007), sendo a sua natureza clonal demonstrada em 1976, em doentes do sexo feminino que apresentavam heterozigotia para a deficiência da enzima G6PD ligada ao cromossoma X. Estudos de clonalidade utilizando a inativação do cromossoma X confirmaram a origem das NMP numa única célula hematopoiética, tendo-se verificado que todas as células sanguíneas resultantes apresentavam a mesma deficiência (Schafer A, 2006; Kralovics R, 2008). De facto, a maioria dos doentes com NMP têm uma população clonal de células mielóides e eritróides sugerindo que estas doenças surgem por alteração dos progenitores hematopoiéticos, ou seja são doenças clonais da célula estaminal hematopoiética.

Além da predisposição genética descrita em algumas famílias, na maior parte dos doentes a causa fundamental é desconhecida. No entanto, a exposição ocupacional a tóxicos como o petróleo e o benzeno e a exposição à radiação ionizante em baixas doses (Thiele J *et al.*,2008; Swerdlow SH *et al.*,2008) são alguns dos agentes etiológicos que poderão estar implicados como causas possíveis de NMP. Apesar de não haver fortes evidências, tem também sido sugerido que, indivíduos embalsamadores e administradores de funerárias têm maior predisposição para este tipo de patologias (Tefferi A, 2003).

## **5. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO**

O termo policitemia significa sob o ponto de vista clínico o aumento da massa de glóbulos vermelhos, ou seja, o aumento do hematócrito ou do número absoluto de eritrócitos no sangue, traduzindo um valor de hemoglobina superior a 18,5g/dL no homem e a 16,5g/dL

na mulher. Também pode estar relacionado com outras situações em que ocorre aumento do massa de glóbulos vermelhos como: hemoglobina ou hematócrito acima do percentil 99 relativamente ao valor referência para a idade, sexo e altitude de residência; valores de hemoglobina superiores a 17g/dL nos homens e 15g/dL nas mulheres quando associados a um aumento individual sustentado de 2 g/dl em relação a valores base individuais; massa de eritrócitos 25% acima do valor preditivo médio (Agarwal N *et al.*,2007).

A policitemia pode ser classificada de acordo com a capacidade de resposta dos precursores eritróides a citocinas circulantes. Neste sentido, a policitemia pode ser Primária, Secundária e por sensação de hipoxia anormal (Agarwal N *et al.*,2007).

A **Policitemia Primária** é caracterizada por uma resposta aumentada dos progenitores eritróides a citocinas circulantes, devido a defeitos intrínsecos (adquiridos/somáticos ou hereditários/germinativos) nesses precursores. Daqui resulta diminuição da apoptose na série eritróide, com conseqüente acumulação de eritrócitos e produção de hemoglobina totalmente dissociada das necessidades de oxigênio dos tecidos e da via sensor de oxigênio.

A PV é a Policitemia primária mais comum. As células progenitoras da MO na PV podem formar colônias eritróides na ausência de Eritropoietina (Epo) *in vitro* (Maran e Prchal, 2004). Estas colônias eritróides endógenas (CEE) são úteis no diagnóstico diferencial de PV e Policitemias secundárias.

Nas **Policitemias Secundárias** a eritrocitose resulta da resposta fisiológica normal dos progenitores eritróides a citocinas circulantes, à hipoxia tecidular (Tefferi A, 2003), ou a níveis anormalmente elevados de factores circulantes envolvidos na eritropoiese, como o IGF-1, a Epo sérica e o cobalto. A hipoxia crónica e vários tipos de tumores que levam à produção



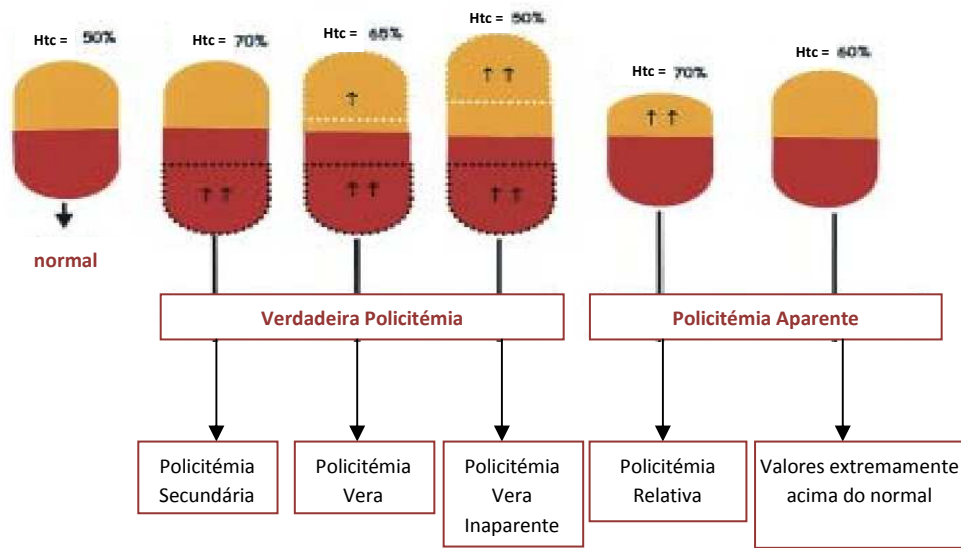
aumentada de Epo, são as causas mais comuns de policitemia secundária (Agarwal N *et al.*,2007).

As **Policitémias devido a sensação de hipóxia anormal** incluem a policitemia Chuvash, uma policitemia hereditária autossómica recessiva com aumento dos níveis de Epo, as policitemias associadas às mutações de von Hippel-Lindau, outras mutações além da policitemia Chuvash e a policitemia associada à mutação da prolina hidroxilase.

As Policitemias congénitas secundárias resultam de anomalias hereditárias que levam ao aumento dos níveis de Epo, nomeadamente, variantes de hemoglobina com alta afinidade pelo oxigénio, níveis eritrocitários de 2,3BPG congenitamente baixos, metahemoglobinemias hereditárias, doenças cianóticas congénitas ou doenças pulmonares (Agarwal N *et al.*,2007).

A **Policitémia Familiar** é rara e resulta habitualmente da presença de uma hemoglobina de alta afinidade para o oxigénio (exemplo da mutação detectada num estudo familiar, no codão 109 do exão 3 do gene da beta globina que origina a hemoglobina Johnstown) ou de exposição ambiente similar. Estes doentes geralmente são assintomáticos, com esperança de vida normal e não necessitam de tratamento agressivo como o reservado para a PV, o que torna fundamental calcular a afinidade da hemoglobina pelo oxigénio como passo inicial na abordagem de um indivíduo com história pessoal e familiar de policitémia (Agarwal N *et al.*,2007).

Além do referido, como se pode ver na *figura 4*, pode ainda existir uma situação de policitémia relativa devido a factores que causam deplecção de volume como a desidratação severa, a diarreia, o uso de diuréticos, vómitos, queimaduras severas, entre outros. Neste caso não são necessários testes específicos para a confirmação do diagnóstico (Tefferi A, 2003).



**Figura 4.** Relação entre a massa de células vermelhas e o volume plasmático nos diferentes tipos de policitemias. (Adaptado de Tefferi A., 2003)

Deve-se salientar também a importância da identificação da mutação JAK2V617F para o diagnóstico diferencial entre PV e policitemias secundárias (Schafer A, 2006).

## 6. BASES GENÉTICAS E MOLECULARES

A base genética da PV é ainda incerta, as anomalias cariotípicas são inespecíficas (Haferlach T, 2008; Gaikwad e Nussenzveig, 2007; Steensma e Tefferi, 2003; Tefferi A, 2003) e não se conhece totalmente quais as células progenitoras hematopoiéticas envolvidas (Spivak J et al, 2003).

Sabe-se que esta doença é geneticamente heterogênea, o que está de acordo com os estudos do padrão de inativação do cromossoma X, a formação de colónias eritróides independentes da Epo e a sobre-expressão do PRV-1 (Baxter E et al, 2005). Um clone anormal está presente em 10-20% dos doentes não tratados e as anomalias genéticas

coincidem com as tipicamente encontradas nas NMP. Nas fases mais tardias da doença, a frequência das anomalias genéticas pode atingir valores na ordem dos 80%.

As cinco anomalias citogenéticas mais frequentes nas NMP são, por ordem decrescente de frequência, a del20q (Kralovics R *et al.*,2005), a trissomia 8 (até 20% dos casos), a trissomia 9 (em 6,6-9% dos casos (Haferlach T, 2008; Zhao e Xing, 2005), ganhos de 1q e a del13q. Em 2/3 dos casos que se apresentam com anomalias citogenéticas existe pelo menos uma destas alterações. Apesar da presença de anomalias cromossômicas ao diagnóstico não ser preditiva do resultado clínico, mudanças no cariótipo são sinal de mau prognóstico. Outras anomalias menos comuns são a del (9p) (Skoda R, 2007; Swerdlow SH *et al.*,2008) e a perda do cromossoma Y no homem (*Tabela 4*) (Steensma e Tefferi, 2003).

Na fase leucémica da doença, têm sido observadas a del7 (20% dos doentes) e a del5q (40%) (Spivak J *et al.*, 2003), não se sabendo se estas anomalias estarão ou não relacionadas com a terapêutica instituída a estes doentes.

O gene policitemia rubra vera-1 (PRV-1) e o factor nuclear eritróide derivado 2 (NFE2), são genes cuja expressão se encontra elevada nos granulócitos de doentes com PV e possivelmente noutras NMP (Delhommeau F *et al.*,2006), mas não nos de indivíduos saudáveis ou de doentes com eritrocitose secundária. Mostrou-se que o gene PRV-1 era altamente homólogo ao do antígeno neutrofilico humano-2, sugerindo que poderiam não ser genes separados, mas alelos de um mesmo gene (Tefferi A, 2003). A sobre-expressão do mRNA do gene PRV-1 parece específico para as NMPs, em particular na PV, não tendo sido identificada na eritrocitose secundária (Tutaeva V *et al.*,2007). Mas, a ausência de expressão de PRV-1 não deve ser motivo para a exclusão do diagnóstico de PV (Spivak J *et al.*,2003).

**Tabela 4. Anomalias citogenéticas e moleculares na PV.**

<b>Lesão citogenética</b>	<b>Associação</b>
<b>Trissomia 9</b>	Associada à mutação JAK2V617F; amplifica o gene JAK2.
<b>Trissomia 8</b>	Os genes alvo não estão ainda identificados; encontra-se nas NMP, mielodisplasia e LMA.
<b>Trissomia 1q</b>	Papel na metaplasia mielóide e mielofibrose pós PV.
<b>Delecções 5q e 7q</b>	Pensa-se que reflecte alterações secundárias à terapia citotóxica; os genes alvo não estão identificados.
<b>Delecção 20q</b>	Aparece nas NMPs e mielodisplasia; associada à mutação JAK2V617F, precedendo-a em alguns casos. Os genes alvo não estão identificados.
<b>Delecção 13q</b>	Associada a MFI.
<b>Genes e proteínas desreguladas</b>	<b>Associação</b>
<b>BCL-XL</b>	Expressão aumentada na PV como resultado da sinalização constitutiva JAK-STAT; efeito anti-apoptótico nas células eritróides.
<b>NFE2</b>	Sobre-expressão nas NMP JAK2V617F positivas; pode afectar a diferenciação eritróide.
<b>PRV1</b>	Nas NMP, em especial na PV, há níveis aumentados de mRNA do gene PRV-1. Se os níveis das proteínas formadas não estiverem aumentados, não parece ter grande papel na patogénese da doença.
<b>ANKRD15</b>	Gene supressor tumoral que se encontra diminuído na PV.
<b>MPL</b>	Papel pouco claro na patogénese das NMP

(Adaptado de Campbell P et al., 2006)

O gene ANKRD15 é um possível gene supressor tumoral localizado numa pequena região do 9p que apresenta perda de heterozigotia e que está diminuído na PV e MFI. No entanto, as consequências das alterações dos genes NF-E2 e ANKRD15 só se manifestam em doentes homozigóticos para a mutação.

A expressão alterada dos genes e/ou proteínas, em particular de Bcl-XL, PRV-1, NF-E2 e Tpo-R, é devida à activação da via JAK/STAT em consequência da mutação

JAK2V617F, o que nos leva a pensar que a expressão anormal destas moléculas poderá ser consequência secundária da mutação primária JAK2 (Schafer A, 2006).

Por outro lado, doentes com a deleção 20q são quase exclusivamente V617F positivos, o que é consistente com a existência de um gene cooperante no 20q. A del(20q) tanto pode surgir antes como depois da mutação JAK2V617F e verificou-se que ocorre também na SMD e leucemia mielóide (Skoda R, 2007).

Nos casos familiares de NMP, a mutação JAK2V617F é adquirida, o que leva a pensar que a predisposição hereditária não está relacionada com a mutação JAK2 (Campbell P *et al.*, 2006). Esta mutação ocorre ao nível de uma célula progenitora primitiva, está presente num número variável de granulócitos e cronologicamente é um evento precoce (Tefferi e Gililand, 2007; Baxter E *et al.*, 2005). Já o clone com a del(20q), pensa-se que estará presente na MO, mas ausente nos granulócitos clonais do Sp (Skoda R, 2007).

Apesar da mutação JAK2V617F ser adquirida, há estudos que revelam que os familiares em 1º grau de doentes com NMPs tem um risco de 5 a 7 vezes superior de desenvolver NMP, relativamente à restante população. Este facto apoia a hipótese de que existem genes de susceptibilidade partilhados predominantes, que predispõem à PV, TE, MFI e possivelmente à LMC. Existem também evidências que os parentes de doentes com NMP têm risco aumentado de leucemia linfocítica crónica, melanoma maligno e neoplasia cerebral (Landgren O *et al.*, 2008).

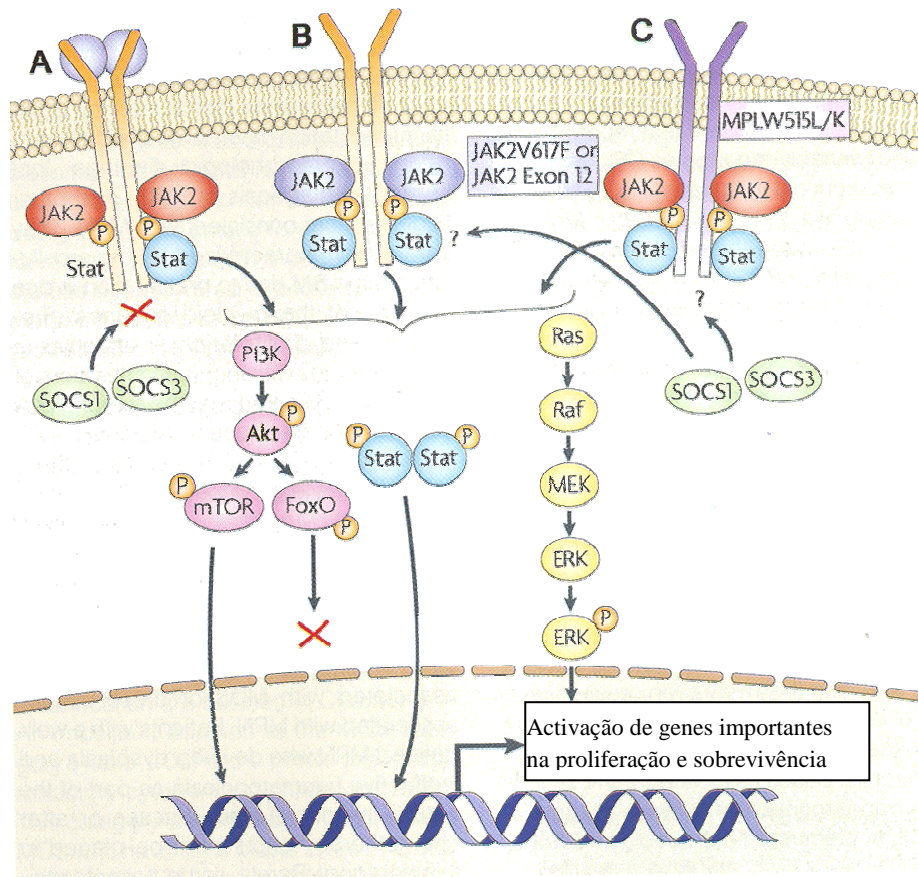
Outras anomalias cromossómicas têm sido descritas como resultantes de quimioterapia prévia, em doentes com NMP tratadas com hidroxureia, <sup>32</sup>P ou clorambucil. As mais frequentes são no cromossoma 17p e mutações pontuais do oncogene Ras (Steensma e

Tefferi, 2003). A activação do Ras pode contribuir para o desenvolvimento de SMD ou para o processo de transformação em LMA.

No entanto, a patogénese molecular das NMP não é ainda totalmente conhecida, embora, na maioria ou mesmo em todas, existam anomalias clonais que envolvem genes que codificam proteínas tirosina cinases citoplasmáticas (PTK) ou os seus receptores (Baxter E *et al.*,2005; Vannucchi A *et al.*,2009).

As anomalias descritas incluem translocações ou mutações pontuais de genes que codificam PTK anormais ou constitutivamente anormais que activam vias de sinalização celulares que conduzem à proliferação anormal. Nos últimos 4 anos além das mutações no gene JAK2 também a mutação do gene MPL foi acrescentada às já anteriormente descritas ABL e KIT, como marcadores moleculares de doença nas NMP (Vannucchi A *et al.*,2009).

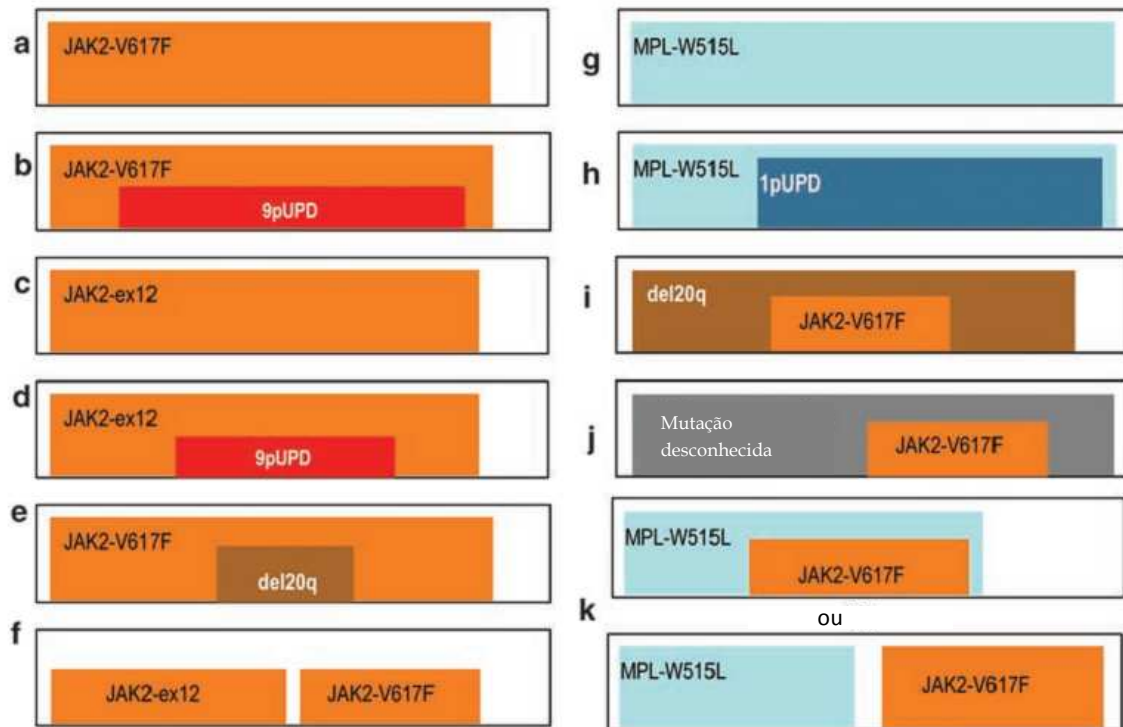
Alguns autores têm demonstrado que as mutações somáticas adquiridas no gene JAK2 no cromossoma 9p24 têm um papel central na patogénese de muitos casos de NMP BCR-ABL1-negativas. Como referimos, a mutação mais comum, a JAK2V617F, resulta numa proteína JAK2 citoplasmática constitutivamente activa que promove a activação de várias moléculas e vias de sinalização, como a JAK/STAT, a RAS/MAPK e a PI3K/AKT, envolvidas na transformação e proliferação dos progenitores hematopoiéticos (Figura 5).



**Figura 5. Vias de sinalização activadas pela mutação JAK2.** Em A as citocinas normalmente ligam-se aos seus receptores, resultando na fosforilação da JAK2, recrutamento das proteínas de sinalização do STAT, fosforilando e activando a cascata de sinalização das vias STAT, MAPK E PI3K-AKT. Em B, as cinases mutantes JAK2V617F e exão 12 do JAK2 ligam-se a receptores citocina, são fosforiladas na ausência de ligando e levam a uma activação das vias de sinalização ligando-independente. Em C os receptores de Tpo com a mutação MPLW515L/K são capazes de fosforilar o JAK2 normal na ausência da Tpo, resultando na activação das cascatas de sinalização do JAK2. A regulação negativa da sinalização JAK2 é normalmente mediada por proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS1 e 3); dados recentes indicaram que o alelo JAK2V617F podia escapar ao feedback negativo através da SOCS3. (Adaptado de Swerdlow HS e tal, 2008)

As mutações somáticas nas NMP não parecem adquiridas numa ordem pré-determinada, como acontece com outras doenças malignas, mas antes aleatória (Kralovics R, 2008). A variabilidade de mutações somáticas e de alterações cromossómicas que ocorrem estabelecem com clareza a heterogeneidade genética das NMP. Como consequência, a aquisição de mais de uma destas alterações no mesmo doente, contribui para a diversidade

clonal entre doentes. Foram encontrados doentes com a presença simultânea de mutações JAK2V617F e JAK2-ex12 (figura 6) ou a coexistência de alterações cromossômicas como a trissomia do 8 e do 9 (Kralovics R, 2008).



**Figura 6. Heterogeneidade genética nas NMP** (a-c) Mutações simples mais comuns; alguns doentes homocigóticos para JAK2V617F têm uma população de células com dissomia uniparental 9p; (d) Alguns doentes com JAK2-ex12 adquirem dissomia uniparental 9pUPD; (e,i) Pode coexistir a del(20q) em doentes com JAK2V617F e vice-versa; (f) Doente com JAK2V617F e JAK2-ex12 em simultâneo, dois clones celulares; (g-h) mutações simples no caso de MPL e associação a 1qUPD; (j) Existência de mutações desconhecidas em doentes JAK2V617F; (K) Coexistência de JAK2V617F e MPL. (Adaptado de Kralovics R, 2008)

A mutação JAK2V617F é encontrada em quase todos os doentes com PV e em aproximadamente metade dos doentes com MFI e TE. Mas, é importante salientar que nem a JAK2V617F é específica de qualquer NMP, nem a sua ausência exclui o diagnóstico (Tefferi e Gililand, 2007; Tefferi A, 2006).



Enquanto que numa pequena percentagem de doentes sem JAK2V617F, uma mutação activadora do exão 12 do JAK2 pode ser encontrada, numa pequena proporção de casos de MFI e TE, uma mutação activadora do MPL W515K é observada (Tefferi e Gililand, 2007).

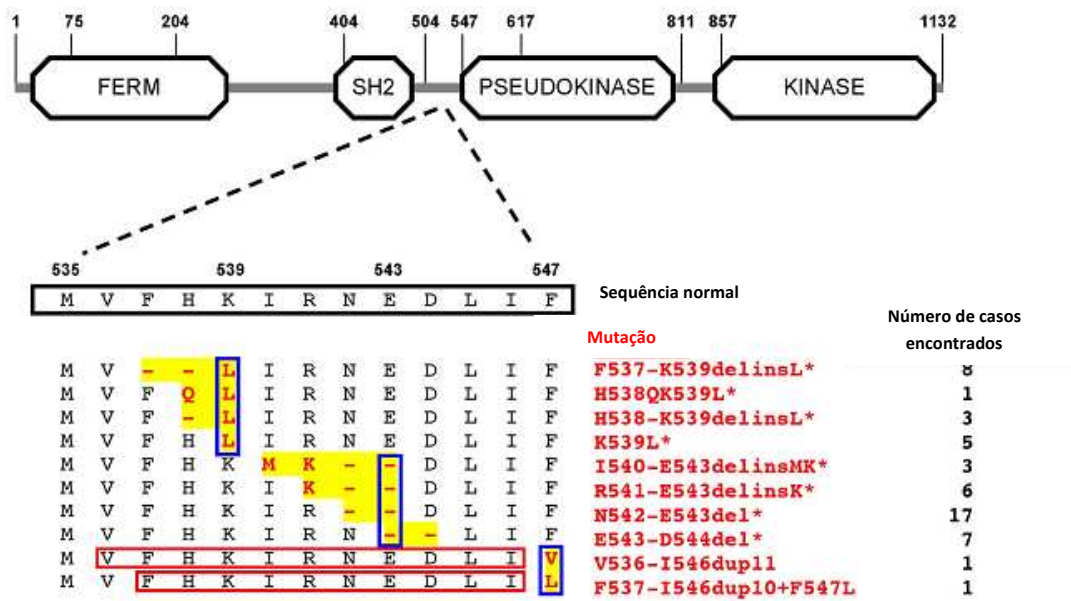
No exão 12 do gene JAK2 podem ocorrer anomalias genéticas (ex: inserções, deleções de 3-6 bases, mutações) tendo sido identificadas 3 categorias de lesões moleculares: as que envolvem substituição K539L; as que envolvem deleção de um ácido glutâmico 543 (E543del) e as duplicações de aminoácidos que envolvem a substituição de uma fenilalanina 547. Com base em estudos efectuados, as mutações do exão 12 mais frequentes até então detectadas são a N542-E543del, a F537-K539delinsL e a E543-D544del (*figura 7*), com relevância funcional similar às mutações do JAK2V617F (Pietra D *et al.*, 2008; Tefferi e Gililand, 2007). Estas mutações, que provavelmente representam menos de 2% dos doentes com PV, afectam a proliferação e diferenciação de células autónomas, de modo semelhante ao alelo V617F (Vannucchi A *et al.*, 2009).

Neste exão 12 foram detectadas ainda mutações em granulócitos purificados, monócitos e plaquetas, mas as células linfóides mostraram um envolvimento variável estando a mutação ausente nas células T. As maiores cargas alélicas foram encontradas nas plaquetas e as mais baixas nos monócitos (Li S *et al.*, 2008). Os estudos de Li *et al.* (2008) mostraram que existem doentes, quer com a mutação JAK2V617F quer com a do exão 12, que têm uma determinada proporção de CEE que são negativas para ambas as mutações, e outros que apresentam clones independentes para ambas as mutações. A descoberta da heterozigotia clonal é um argumento a favor da hipótese de que eventos clonais adicionais estão envolvidos na patogénese da PV. De facto, a mutação no exão 12 do gene JAK2 encontra-se em doentes com PV negativos para o JAK2V617F e em alguns doentes com eritrocitose idiopática (Li S *et al.*, 2008).

**Tabela 5. Classificação molecular básica das NMP baseada nas alterações genéticas e moleculares**

<b>Doença mieloproliferativa (DMP)</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Categorização molecular/ genes PTK mutantes</b>
<b>DMP Clássicas</b>	1. Leucemia Mieloide Crónica (LMC)	100% BCR-ABL (+)
	2. Policitemia Vera (PV)	±90-95% JAK2V617F (+) ±5% mutações do exão12 do JAK2.
	3. Trombocitémia essencial (TE)	± 50% JAK2V617F (+) ± 1% MPLW515L/K (+)
	4. Mielofibrose Idiopática (MFI)	±50% JAK2V617F (+) ± 5% MPLW515L/K (+)
<b>DMP «Não clássicas»</b>	1. Leucemia Neutrófila Crónica	±20% JAK2V617F (+)
	2. Leucemia Eosinofílica Crónica	100% FIP1L1-PDGFRΑ (+) ou translocação PDGFRB
	3. Síndrome hipereosinofílico	
	4. Leucemia Basofílica Crónica	
	5. Leucemia Mielomonocítica Crónica	± 3% JAK2V617F (+)
	6. Leucemia Mielomonocítica Juvenil	±30% mutação PTPN11(+) ±15% mutação NF1(+) ±15% mutação RAS(+)
	7. Mastocitose Sistémica	±100% mutação KITD816V(+)
	8. Síndrome Leucemia-Linfoma das Células Mãe	100% translocações FGFR1
	9. Doenças mieloproliferativas não classificáveis de outro modo.	±20-50% JAK2V617F (+)

(Adaptado de Tefferi and Gililand, 2007).

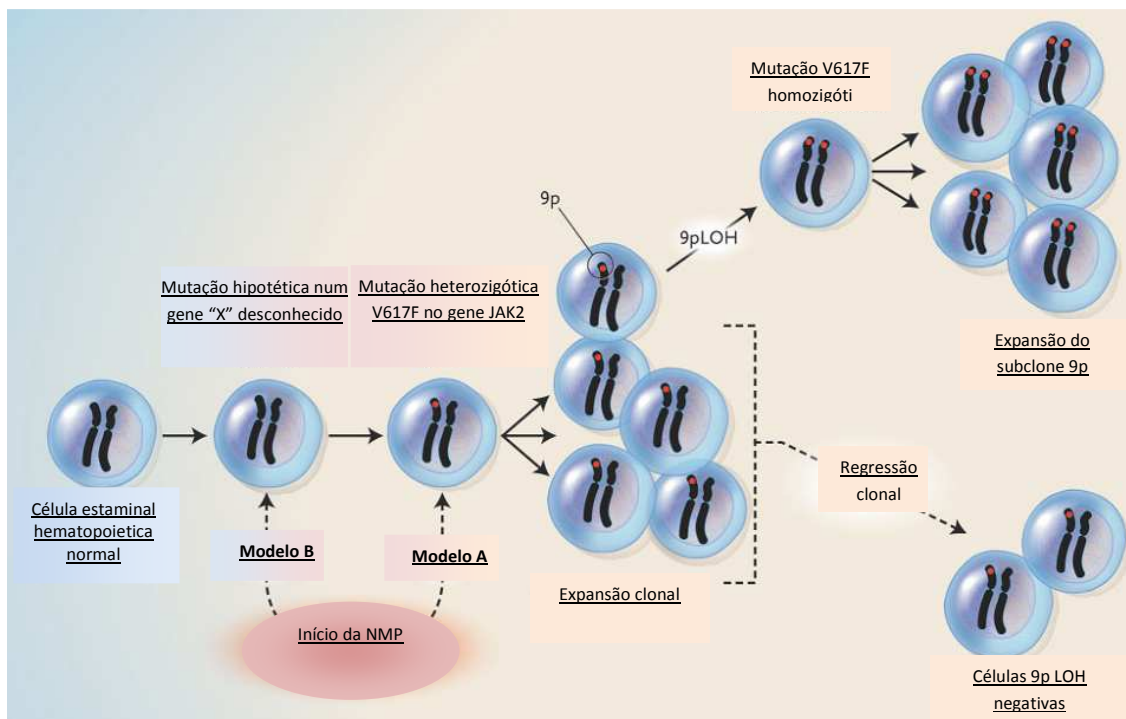


**Figura 7.** Representação esquemática da sequência normal de aminoácidos codificados pelo exão 12 do gene JAK2 e das mutações somáticas detectadas no mesmo exão. Os rearranjos genéticos estão representados a amarelo, as mutações estão a vermelho, os rectângulos vermelhos representam as duplicações de sequências e os rectângulos azuis indicam as 3 categorias de lesões moleculares detectadas – as que envolvem substituição K539L, as que envolvem delecção de um ácido glutâmico 543 (E543del) e as duplicações que envolvem a substituição de uma fenilalanina 547. À direita está o número de casos descritos para cada mutação (*Adaptado de Pietra D et al – 2008*).

A mapeação de microssatélites identificou a perda de heterozigotia (LOH) no braço curto do cromossoma 9, a região 9p LOH já referida (intervalo genómico de 6,2Mbp) que inclui o gene JAK (figura 8) (Kralovics R et al., 2005), sugerindo que o 9p “abriga” uma mutação que contribui para a causa da expansão clonal das células hematopoiéticas nas NMP.

Além da recombinação mitótica, outro mecanismo pode aumentar a actividade da cinase, incluindo a duplicação do alelo mutado, tal como é observado em alguns doentes com PV e MFP que mostram um ganho de 9p, principalmente por trissomia 9 (Delhommeau F et al., 2006). A dissomia uniparental caracteriza-se pela presença de uma grande região em homozigotia, que se estende desde o ponto de recombinação ao restante braço do cromossoma, e que não se acompanha de alterações no número de cópias cromossómicas

(Kralovics R, 2008). Esta dissomia uniparental geralmente está envolvida na amplificação de oncogenes (Kralovics R, 2008). Em adição, a perda de heterozigotia no 9p24, que actualmente se sabe corresponder à mutação JAK2V617F em homozigotia, pode ser identificada em ambas as linhagens de células, mielóides e linfóides, em doentes com PV. Tal sugere que as mutações envolvidas na etiopatogenia da PV ocorrem nas células progenitoras com capacidade de se diferenciarem em diferentes linhagens celulares.



**Figura 8.** Modelos representativos da expansão clonal por perda de heterozigotia no braço curto do cromossoma 9 na PV. Como se pode ver no modelo A, a mutação V617F num alelo do gene JAK2 do cromossoma 9p, representado pelo ponto vermelho, sozinha ou combinada com uma mutação num qualquer gene “X” é o ponto de partida para determinada NMP. No modelo B, a mutação heterozigótica JAK2V617F no cromossoma 9p ocorre após o aparecimento da NMP que foi inicialmente provocada pela mutação de um ou mais genes desconhecidos. As células heterozigóticas para a mutação V617F têm uma vantagem evolutiva sobre células não mutadas. A recombinação mitótica entre regiões homólogas dos dois cromossomas 9p numa célula heterozigótica para a mutação V617F, resulta em perda de heterozigotia do 9p (9p LOH). Uma das células filhas é homozigótica para a mutação V617F, ganhando vantagem evolutiva adicional. (*Adaptado de Kralovics et al., 2005*).

Assim, o ganho de homozigotia na referida região do braço curto do cromossoma 9 em doentes com dissomia uniparental, cuja ocorrência é comum durante a mitose, pode influenciar o fenótipo da doença (Kralovics R, 2008).

A recombinação mitótica é um mecanismo genético frequente na inativação de genes supressores tumorais em tumores sólidos mas não em doenças malignas do sistema hematopoiético (Kralovics R *et al.*, 2005).

Além do referido, é de salientar o facto das células hematopoiéticas, em particular os precursores eritróides, terem sensibilidade aumentada aos respectivos factores de crescimento humorais primários; isto é para a Epo, conduzindo à hiperplasia eritróide. Por outro lado, a proliferação clonal da linhagem eritróide na PV leva à supressão da síntese renal da Epo por um mecanismo de feedback negativo (Schafer A, 2006).

Contrariamente ao que ocorre nas formas familiares de eritrocitose e trombocitose, na PV e ET não foram identificadas ainda mutações da Epo ou da Tpo ou dos respectivos receptores, Epo-R ou Tpo-R. As NMP clássicas, são também caracterizadas por hipersensibilidade e/ou independência do progenitor celular hematopoiético a vários factores de crescimento hematopoiéticos (James C, 2008; Schafer A, 2006) e/ou citocinas diferentes, incluindo a Epo, a IL-3, o factor estimulante de colónias, o factor de crescimento insulina-like-1 (IGF-1), o factor estimulante de colónias granulócitos-monócitos e a Tpo (Delhommeau F *et al.*, 2006; Kralovics R *et al.*, 2005; Kaushansky K, 2005). Estas observações sugeriram que anomalias moleculares ao nível dos locais de ligação dos factores de crescimento hematopoiéticos aos seus receptores deverão estar relacionadas com o desenvolvimento destas NMP (Schafer A, 2006). De facto, tanto os progenitores celulares eritróides como mielóides de doentes com PV são hipersensíveis a vários factores de

crescimento diferentes e citocinas, sugerindo que a anomalia primária nas NMP deverá ser num componente sinalizador de múltiplos receptores de factores de crescimento ou em proteínas tirosina-cinase e fosfatases (Baxter E *et al.*, 2005; Zhao e Xing, 2005).

Assim, as mutações no EpoR levam à activação constitutiva do receptor, resultando na activação da JAK2. Além disso, uma das características das células progenitoras eritróides de doentes com PV é a sua capacidade de gerar colónias eritróides na ausência de Epo (Kralovics R *et al.*, 2005), facto a favor desta activação constitutiva na patogénese deste subgrupo de NMPs (Keersmaecker e Cools, 2006).

A TE V617F-positiva tem semelhanças com a PV, uma vez que se apresenta com níveis altos de hemoglobina e leucócitos, MO mais celular, risco de trombose venosa elevado, transformação em PV e grande sensibilidade à hidroxiureia (Campbell P *et al.*, 2006). Estes aspectos sugerem que a trombocitemia V617F-positiva é uma forma frustrada de PV, com o grau de eritrocitose influenciado por diversos factores como as reservas de ferro baixas, os níveis de Epo baixos, o sexo e a homozigotia para V617F (Campbell P *et al.*, 2006).

### **6.1. JAK2 e a mutação V617F**

A fosforilação das tirosinas cinase é um mecanismo regulador fundamental em toda a fisiologia celular, nomeadamente no crescimento, diferenciação e proliferação celular. Este processo é controlado pelas acções coordenadas das proteínas tirosina cinase e fosfatase (PTK e PTP). De acordo com a base de dados do genoma humano, existem cerca de 90 PTKs e 38 fosfotirosinas específicas (Zhao e Xing, 2005).

As proteína cinases ou fosfotransferases catalizam a transferência de um grupo fosfato de um nucleótido trifosfatado de purina, ATP ou GTP, para o grupo hidroxil dos seus

substratos, habitualmente um aminoácido hidroxilado, a serina, a treonina e a tirosina. Por isso, as proteínas cinase são designadas serina/treonina cinases, tirosina cinases ou cinases duplas (Barbui e Finazzi, 2007). No nosso organismo, as fosforilações ocorrem mais frequentemente em resíduos de serina e/ou treonina, e menos frequentemente (inferior a 0,1%) em resíduos de tirosina (Sarmiento Ribeiro AB *et al.*, 2007). Daí que, o excesso de fosforilação em resíduos de tirosina seja um dos mecanismos implicados no cancro), como por exemplo nas neoplasias hematológicas (Sarmiento Ribeiro AB, 2002).

Enquanto que os receptores para os factores de crescimento tem actividade intrínseca de tirosina cinase, os receptores de citocinas tipo I e II representam uma classe estruturalmente diferente de receptores que necessitam de tirosina cinases citoplasmáticas adicionais para mediar a transdução de sinal. Estas tirosina cinases denominam-se JAKs (“*Janus Kinase ou Just Another Kinase*”) estão associadas a domínios intracelulares dos receptores de citocinas e de factores de crescimento, como o receptor da Epo no retículo endoplasmático (Barbui and Finazzi, 2007).

No genoma humano foram identificadas 4 JAKs, a Tyk2, a JAK1, a JAK2 e a JAK3. A Tyk2 é essencial para a sinalização mediada pelo INF, enquanto as outras JAKs são activadas por variadas citocinas estando associadas a diferentes receptores (Pesu e Laurence, 2008).

A JAK2 é uma das tirosina cinase citoplasmáticas com importância no sistema hematopoiético, em particular na sinalização mediada pela Epo. A ligação da Epo ao seu receptor leva à alteração conformacional deste com consequente activação e fosforilação da JAK2. Uma vez activada a JAK2, estabelece-se uma ampla cascata de sinalização intracelular que inclui os STATs, com activação da via JAK-STAT. Além desta via, a JAK2 também pode

activar a via de sinalização do PI3K e da RAS-MAPK, e, deste modo, levar à proliferação celular, neste caso da série eritróide (ver figuras 5 e 9) (Spivak J *et al.*, 2003).

Para além do Epo-R, a JAK2 também medeia a sinalização de várias subfamílias de receptores hematopoiéticos sem actividade tirosina cinase endógena, tais como receptores homodiméricos tipo-1, o Tpo-R, o Mpl e o G-CSF-R, e receptores heterodiméricos tipo 1 e tipo 2, como a gp130 e a família de receptores da IL-3 e INF- $\alpha$ . Depois da ligação da respectiva citocina, duas proteínas JAK associam-se ao domínio citosólico do receptor que é activado por transfosforilação em resíduos tirosina. Isto induz o recrutamento e fosforilação de cinases como a enzima PI3K, a proteína RAS e o factor de transcrição STAT5. A JAK2, fosforila directamente o STAT5, levando à sua dimerização e translocação para o núcleo (Delhommeau *et al.*, 2006).

A translocação destes factores de transcrição para o núcleo induz a transcrição de genes alvo específicos envolvidos na regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose. Além disso, também promove a maturação celular, sendo ainda necessário para a eficiente movimentação de receptores homodiméricos tipo-1, tais como o Epo-R e Mpl, e para a estabilização da forma madura de Mpl e sua reciclagem. Estes dois processos estão deficientes nas NMP (Delhommeau F *et al.*, 2006).

O locus do gene mutado está no cromossoma 9p com os pontos de quebra estendendo-se ao longo do cromossoma 9p entre o locus do JAK2 e o centrómero, sugerindo a inexistência de um ponto único frágil, susceptível para a recombinação. Assim, a mutação com origem num dos alelos, pode estender-se ao outro, por recombinação mitótica, levando a duplicações do alelo mutado JAK2V617F e desaparecimento do JAK2V617F normal (James C, 2008; Levine e Werning, 2006), ou seja ocorre perda de heterozigotia (figura 9C) e a



expansão do clone torna-se mais eficaz (Vannucchi A *et al.*, 2009; Spivak J *et al.*, 2003). Esta situação é típica da PV e da MFI, sendo pouco comum na TE. A célula afectada por estas mutações apresenta alteração na transcrição, na regulação do ciclo celular, na proliferação, diferenciação e apoptose.

A prevalência do número de eritrócitos homozigóticos para a mutação JAK2 aumenta com o tempo, presumivelmente devido à vantagem proliferativa ou de sobrevivência das células progenitoras mutantes. O ganho de homozigotia pode ser detectado por sequenciação do ADN dos granulócitos em cerca de 30% de doentes com PV (Ishii T *et al.*, 2007). Quando foram estudadas as colónias de progenitores celulares hematopoiéticos dos doentes, aproximadamente 90% deles eram homozigóticos para a mutação V617F. Contrariamente, não foram encontradas colónias progenitoras hematopoiéticas na TE sugerindo que a homozigotia promove o desenvolvimento da PV (Campbell P *et al.*, 2006).

Apesar da descoberta de 4 tipos de cinases JAK, apenas a JAK2 parece ser particularmente importante na mieloproliferação, uma vez que, como referido, os receptores da Epo, da Tpo, do G-CSF, do factor de células progenitoras, da IL-3 e da IL-5 utilizam esta cinase para a transdução de sinal (Kaushansky K, 2006). Além disso, a mutação JAK2V617F, é a mutação JAK mais relevante nas NMP (Tefferi e Gililand, 2007).

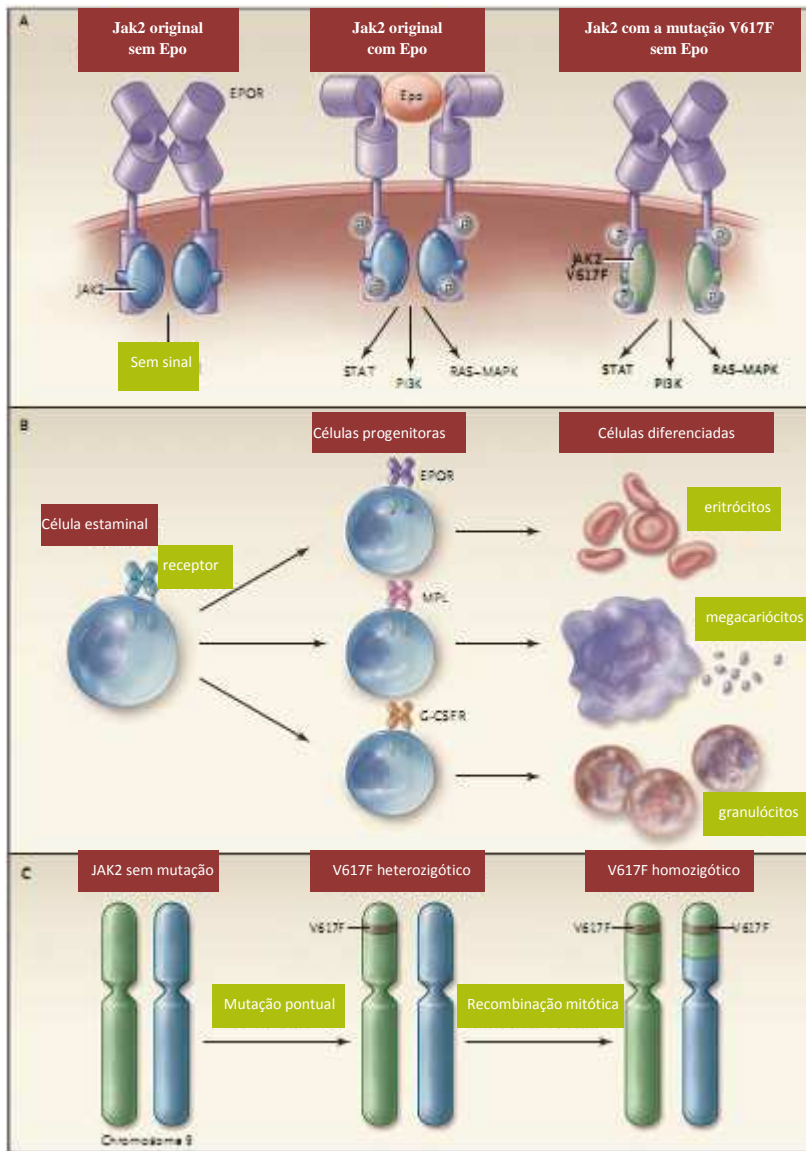
Por outro lado, a JAK3 desempenha um papel activo na resposta imune, levando a pensar que poderá ter implicações importantes para o desenvolvimento de uma nova classe de imunossuppressores (Pesu e Laurence, 2008). Associa-se apenas a um receptor de citocinas, habitualmente a cadeia gama comum, que é uma subunidade dos receptores para as interleucinas IL-2, IL-4, IL-9, IL15 e IL-21. No homem, a mutação da cadeia gama comum resulta numa imunodeficiência combinada severa (SCID) sem outras deficiências. Assim, as

mutações no gene que codifica a proteína JAK3 podem originar a SCID, no caso de deleções, ou a Leucemia Megacariocítica Aguda no caso de ocorrer ganho de função (Pesu e Laurence, 2008).

Já a ausência de JAK1 e JAK2 é letal levando à ausência de eritropoiese definitiva (JAK2) e do desenvolvimento linfóide normal (JAK1) (Tefferi e Gililand, 2007) e as células falham na resposta à Epo, Tpo, INF- $\gamma$ , IL-3 ou GM-CSF (Pesu e Laurence, 2008). Estudos efectuados em ratos deficientes em JAK2, mostram que estes morrem durante a vida embrionária com ausência completa de eritropoiese definitiva, uma descoberta que sublinha o papel vital do JAK2 como transdutor da sinalização mediada pela ligação da Epo ao seu receptor (figuras 5 e 9) (Campbell *et al.*, 2006).

Por outro lado, a supressão dos genes JAK3 e TYK2 em ratinhos origina imunodeficiência combinada severa (JAK3) ou diminuição da sinalização mediada pelo interferão (TYK2) (Tefferi e Gililand, 2007). Foi também recentemente demonstrado que JAK2 e Tyk2 promovem a localização na superfície celular do Tpo-R e protegem-no da degradação proteasomica.

O gene *JAK2* está ainda implicado na regulação da expressão do gene *Mpl*, que codifica o receptor para a Tpo, na superfície celular. De facto, observa-se uma relação recíproca entre a percentagem de alelos neutrofílicos JAK2V617F e a expressão de *Mpl* plaquetar em doentes com PV, MFI e TE JAK2V617F positivos, estando a expressão de *Mpl* plaquetar severamente prejudicada nos doentes JAK2V617F negativos.



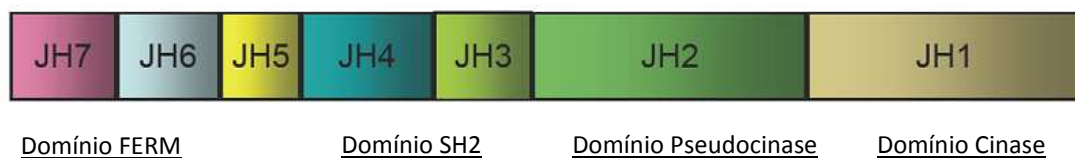
**Figura 9. Papel da proteína JAK2 sinaliza o celular mediada pela Epo.** A figura representa em **A**, o papel da JAK2 na sinaliza o celular mediada pela Epo; em **B**, a diferencia o das células progenitoras a partir da célula estaminal; em **C**, o desenvolvimento da muta o pontual JAK2V617F no braço curto do cromossoma 9 e o papel da recombina o mitótica no desenvolvimento da muta o em homozigotia (Adaptado de Campbell P *et al.*, 2006 ).

Como vimos, o *status* al lico do JAK2V617F não está necessariamente relacionado com o fenótipo clínico da NMP, mas o grau de comprometimento da expressão plaquetar de Mpl está. O Mpl tem a sua expressão reduzida nas plaquetas e megacariócitos de doentes com

PV, facto a favor da hematopoiese exuberante (Spivak *et al.*, 2003). Conclui-se que, a expressão aberrante de Mpl pode ser um denominador comum na sinalização celular em ambos os subtipos de NMP, JAK2V617F positivas e negativas (Moliterno *et al.*, 2006).

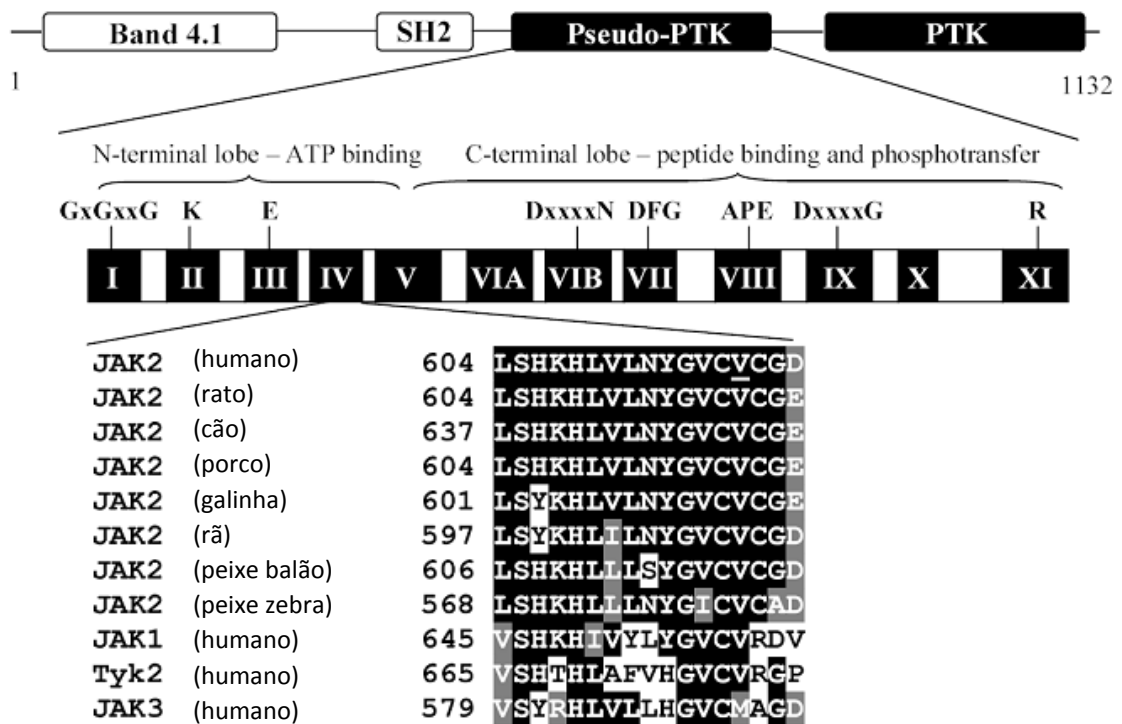
### 6.1.1. Estrutura do gene e da proteína JAK

A estrutura da família de PTK, JAK2, pode ser dividida em 7 domínios de homologia (JH), como se pode ver na *figura 9.1* (Kota J *et al.*, 2008), dos quais apenas 4 são considerados *major* (Zhao e Xing, 2005). São tirosinas cinase invulgares uma vez que contêm 2 domínios de cinase homólogos: um domínio cinase cataliticamente activo, JH1, e um domínio muito idêntico a este primeiro na sequência de amino-ácidos, mas com défice de actividade catalítica, JH2 (inactivo), também denominado pseudocinase. Pensa-se que o domínio JH2 desempenha um papel na auto-regulação negativa (domínio auto-inibitório, que suprime a actividade de cinase da JAK2), de tal modo que, deleções neste domínio provocam a activação constitutiva da cinase JAK2. O domínio SH2 é constituído pelos domínios de homologia 3 e 4, sendo a sua função desconhecida (James C, 2008; Kota J *et al.*, 2008; Tefferi e Gililand, 2007; Kaushansky K, 2006).



**Figura 9.1. Estrutura da Cinase Janus.** O domínio JH1 (carboxi terminal) é estruturalmente homólogo ao de outras PTK, mas funcionalmente distinto. O domínio JH2 é um domínio de pseudo-cinase, sem actividade catalítica mas com função importante na regulação enzimática. Existe ainda um domínio SH2 com duas JH homólogas, mas cuja função se desconhece. Por fim, o domínio denominado por banda 4.1 ou FERM, contém o amino-ácido terminal que medeia interacções proteína-proteína, tem função de regulação da actividade de cinase e geralmente está intacto na proteína JAK2V617 (Adaptado de *Pesu and Laurence, 2008; James C, 2008; Zhao and Xing, 2005 e Kaushansky K, 2006*).

Este domínio de pseudocinase, JH2, tem deficiência em aminoácidos essenciais presentes nas cinases activas, como se pode ver na *figura 10*. Assim, a terceira Gly do motivo GXGXXG no subdomínio I, é substituído por Thr; a ASP no motivo DxxxN no subdomínio VIB é substituída por ALA e a DFG no subdomínio VII é substituída por DPG. As alterações destes resíduos tornam o domínio de pseudocinase cataliticamente inactivo (Zhao R *et al.*, 2005).



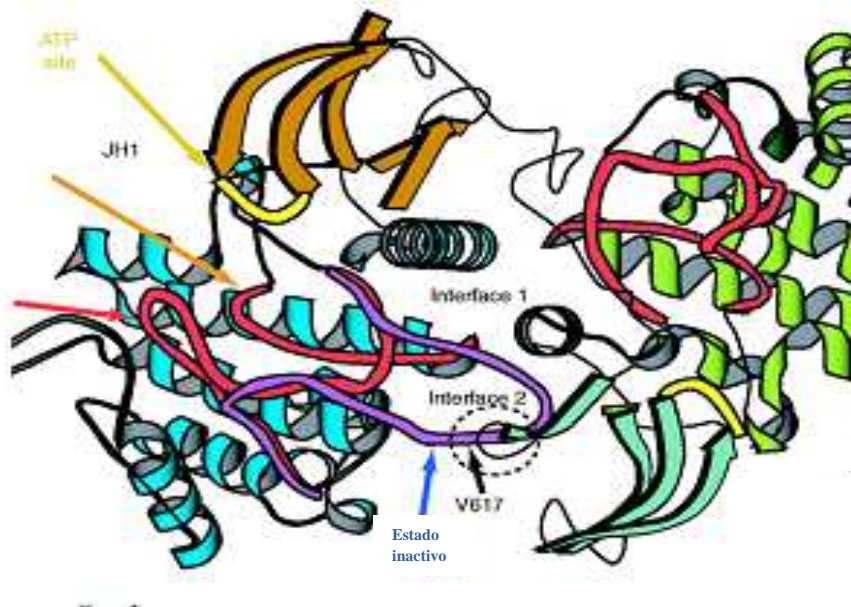
**Figura 10.** Representação dos resíduos que tornam o domínio de pseudocinase inactivo. (Adaptado de Zhao R *et al.*, 2005).

Tal como as outras proteínas cinase, as JAK têm uma «ansa de activação» que regula a actividade da cinase, e que é um local *major* de autofosforilação. A fosforilação neste local permite que os membros da família de reguladores negativos, os supressores de sinalização das citocinas, SOCS1, se liguem e inibam a actividade da JAK.

O que torna a estrutura da JAK única é a existência do domínio pseudoquinase imediatamente antes do domínio de cinase N-terminal (figura 10). Além disso o terminal aminico da JAK compreende o domínio FERM (banda 4.1, ezrin, radixin, moesin), cuja identificação de mutações mostra que este medeia a ligação da JAK ao receptor da citocina relacionada e participa na sinalização celular intracitoplasmática sequencial, ou seja, regula a actividade da cinase. De facto, a interacção entre a JAK e o EpoR ou TpoR é desfeita quando ocorre a mutação (y114A) no domínio FERM, ou seja, é necessário um domínio FERM intacto para a sinalização constitutiva da JAK2V617F.

### **6.1.2. A Mutação JAK2V617F**

Como referido, foi recentemente descrito nas NMP (2005) uma mutação no gene *JAK2*, localizada no interior do domínio JH2 (Janus homology 2), a JAK2V617F. Trata-se de uma mutação somática em que uma guanina é substituída por timina na posição 617 (figura 11), do exão 14, no nucleótido 1849, resultando na substituição de valina por fenilalanina (Tefferi e Gililand, 2007). É uma mutação com ganho de função em que se perde a acção auto-inibitória de JH2 resultando na expressão de uma tirosina cinase JAK2 constitutivamente activada. A JAK2 mutada, JAK2V617F, pode assim ligar-se a um receptor e recrutar os STATs, mesmo na ausência ou na presença de quantidades vestígias de factor de crescimento hematopoiético (Barbui e Finazzi, 2007; Levine e Werning, 2006).



**Figura 11. Estrutura da proteína JAK2.** A figura mostra o local onde se encontra a mutação V617F (*Adaptada de Pesu e Laurence, 2008*).

Várias linhas de evidência indicam que a JAK2V617F tem um papel na patogênese das NMP, não sendo apenas uma mutação passageira que surge por coincidência na mesma célula progenitora. A expressão do *JAK2* mutado (mas não do tipo primitivo de *JAK2*) induz hipersensibilidade à Epo e sobrevivência de culturas de linhagens de células *in vitro* independentemente da Epo. Estudos de correlação clínica revelaram que os doentes portadores de JAK2V617F têm uma sobrevida livre de doença mais curta, necessitam de tratamento com agentes citorrredutores e apresentam mais complicações, em particular trombose, hemorragia e mielofibrose (Kralovics R *et al.*, 2005), relativamente aos que têm JAK2 normal (Schafer A, 2006).

A mutação JAK2V617F ocorre em mais de 95% (Vannucchi A *et al.*, 2009; Guglielmelli P *et al.*, 2008; Kota J *et al.*, 2008) dos casos de PV. Nos restantes 5% remanescentes, a maioria dos doentes com PV que são V617F negativos, são positivos para outra mutação activadora do JAK2, daí que, virtualmente todos os doentes com PV tenham

uma mutação do *JAK2* (Swerdlow SH *et al.*, 2008). Além disso, esta mutação também se encontra em cerca de 60% dos casos de TE ou MFP (Kralovics R, 2008), em 40-50% dos casos de anemia refractária com sideroblastos em anel e trombocitose (Vannucchi A *et al.*, 2009) e numa pequena percentagem de doentes com SHE, leucemia mielomonocítica crónica, LNC, mielodisplasia, ou LMA, sendo bastante rara nestes 2 últimos. Para explicar esta diferença, existem várias hipóteses, uma pouco provável refere a possibilidade da mutação ocorrer a diferentes níveis na célula progenitora; outra explicação aponta os diferentes níveis de expressão V617F.

De salientar que a mutação V617F não foi identificada noutras doenças neoplásicas ou hematológicas. No entanto, em mais de 50% de doentes com síndrome de Budd-Chiari foi, de modo inexplicado identificada, sugerindo a presença de uma NMP oculta nestes doentes (Campbell P *et al.*, 2006).

Estudos bioquímicos mostraram que a presença da mutação JAK2V617F induz fosforilação constitutiva de citocinas JAK2 e activação dos factores de transcrição envolvidos nas vias de sinalização mediadas pelo receptor da Epo, as vias JAK/STAT, PI3K/AKT e MAPK/RAS/ERK (figura 12). Além disso pode ocorrer hipersensibilidade à Epo e independência dos progenitores eritróides (Gaikwad e Nussenzveig, 2007; Levine e Werning, 2006; Baxter E *et al.*, 2005).

Quando se analisa, *in vitro*, a proporção de células hematopoiéticas que expressam a mutação JAK2V617F em doentes com PV, verifica-se que esta diminui com a diferenciação das células CD34+. Todavia, as células mutadas mantêm a capacidade de proliferar mais rapidamente do que as outras. Por outro lado, o aumento da expansão dos progenitores *in*



*vitro* pode estar relacionada quer com a inibição da apoptose quer com o aumento da proliferação (Gaikwad e Nussenzveig, 2007).

Além disso, os doentes com PV com elevada “carga” de JAK2V617F têm simultaneamente uma percentagem de células normais significativamente alta (James C, 2008; Ishii T *et al.*, 2007). Apesar da carga de alelos V617F ser elevada preferencialmente em doentes com PV e em menor proporção na MFP e TE, a variabilidade na carga alélica em si, não é critério suficiente para diferenciar estas entidades clínicas nem ajuda a explicar satisfatoriamente o paradoxo «um alelo mutante – diferentes fenótipos clínicos». No entanto, na transformação da PV em mielofibrose, a carga alélica elevada da mutação V617F tem um papel negativo, aumentando a propensão à transformação (Guglielmelli P *et al.*, 2008). Recentemente, foi estabelecida uma relação entre a carga alélica elevada e a contagem leucocitária, o valor de hematócrito ao diagnóstico, o prurido aquagénico, o tamanho do baço e a necessidade de tratamento (Ishii T *et al.*, 2007).

Apesar de tudo, ainda está mal esclarecido como é que uma única mutação V617F pode ser a base de doenças tão diferentes clinicamente, como as NMP clássicas. A existência de polimorfismos num único nucleótido do gene JAK2 tem sido associada preferencialmente à PV, suportando a contribuição de características genéticas herdadas para a variabilidade fenotípica das NMP (Ishii T *et al.*, 2007). Além disso, existem evidências que sugerem que a JAK2V617F pode não ser o evento citogenético inicial nas NMP e que poderá existir uma célula mutada «pré-JAK2» (Vannucchi A *et al.*, 2009; Gaikwad e Nussenzveig, 2007). Alguns referem também que a actividade da cinase JAK2V617F não é afectada pela co-expressão da JAK2 normal (Levine R *et al.*, 2006). Além disso, em crianças com PV, a mutação JAK2V617F é menos frequente do que em adultos com a mesma patologia, sendo mais comum a sobreexpressão do mRNA do gene PRV-1 (Teofili L *et al.*, 2007).

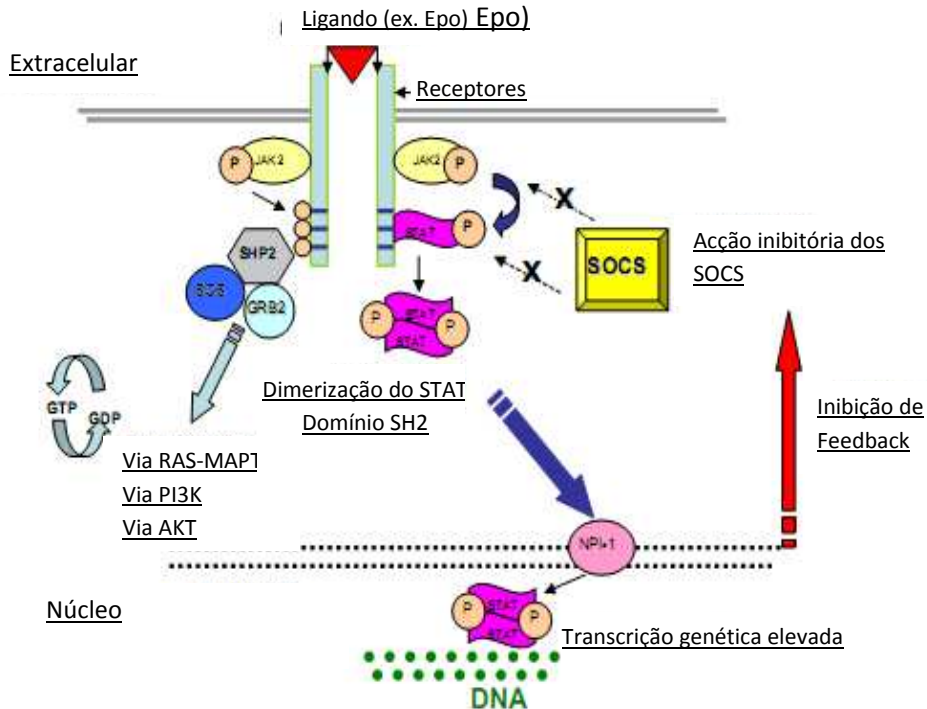
Vários estudos tem demonstrado que a mutação JAK2V617F envolve apenas a linhagem mielóide na maioria dos doentes com PV, sugerindo que a mutação nestes doentes ocorre provavelmente nas células progenitoras hematopoiéticas (CPH) mielóide-específicas. No entanto, numa subpopulação de doentes com PV a mutação JAK2V617F também foi encontrada nos linfócitos B e T, sugerindo que esta mutação pode ter origem em células progenitoras linfomielóides, como foi dito anteriormente. Por último, na PV a mutação também pode ser detectada numa subpopulação CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de células hematopoiéticas primitivas. Estes dados indicam que, pelo menos em alguns doentes com PV, a mutação JAK2V617F se origina ao nível de uma CPH multipotente (Ishii T *et al.*, 2007).

## 6.2. Vias de Sinalização celular

Como mencionado, a mutação JAK2V617F origina uma tirosina cinase constitutivamente activa, a JAK2, capaz de activar por fosforilação as vias de sinalização celulares JAK/STAT, PI3K/AKT e RAS/MAPK/ERK, de modo independente dos respectivos ligandos (citocinas) (figuras 5, 9 e 12). Como se pode ver na figura 12, a JAK2 induz a fosforilação do factor de transcrição STAT e sua posterior dimerização através dos domínios SH2 (Src de homologia 2). Os dímeros formados sofrem translocação para o núcleo através de uma proteína, a NPI-1 (*Nucleoprotein Interactor 1*), com a subsequente regulação da expressão génica dos elementos de resposta do ADN. Além desta via de sinalização podem também ser activadas as vias RAS/MAPK e PI-3K/AKT (Adaptado de McLornan *et al.*, 2006).

A JAK2V617F activa e hiperfosforila a STAT5, similarmente ao que se observa noutras doenças malignas hematológicas ou em tumores sólidos (Gaikwad e Prchal, 2007). O

STAT5 uma vez activado por fosforilação, activa a transcrição de muitos genes importantes na proliferação e sobrevivência celulares (Levine e Werning, 2006).



**Figura 12. Via JAK/STAT.** Após a associação de um ligando ao seu receptor, a proteína JAK2 activada catalisa a fosforilação da tirosina no domínio citoplasmático do receptor e conduz à fosforilação dos factores de transcrição STATs (transdutores de sinal e activadores da transcrição). A fosforilação do STAT leva à sua dimerização através dos domínios Src de homologia 2 (SH2) e translocação para o núcleo através da NPI-1 (via Interactor de Nucleoproteína 1), com a subsequente regulação da expressão dos elementos de resposta do ADN. e da transcrição. Também há interacção com as vias de sequenciação RAS/MAPK, PI-3K e AKT. (Adaptado de *McLornan D et al., 2006*).

No entanto, a mutação JAK2V617F causa activação constitutiva da sinalização mediada tanto pelo STAT5 como pelo STAT3 (Kota J *et al.*, 2008). Vários estudos mostram que na MFP e TE predomina a activação de STAT3, e que a activação da STAT5 é aparentemente baixa na TE e inexistente na MFP. Por outro lado, na PV foi demonstrado um predomínio de fosforilação dos dois factores de transcrição, STAT3 e 5. Assim, a activação

constitutiva da sinalização STAT3 e STAT5 parece ser o determinante *major* nas NMPs, independentemente da JAK2 ou da mutação do receptor de citocinas (Kota J *et al.*, 2008).

Além do envolvimento da JAK2 mutada na activação de múltiplas vias de sinalização celulares envolvidas na proliferação, diferenciação e regulação do ciclo celular, a supressão da apoptose é outro dos mecanismos prováveis na patogénese das NMP. Alguns destes mecanismos incluem a sobre-expressão da proteína de sobrevivência celular, BCL-XL, nos progenitores eritróides em doentes com PV, provavelmente como resultado de um aumento da sinalização JAK-STAT (Gaikwad A *et al.*, 2007, Schafer A, 2006).

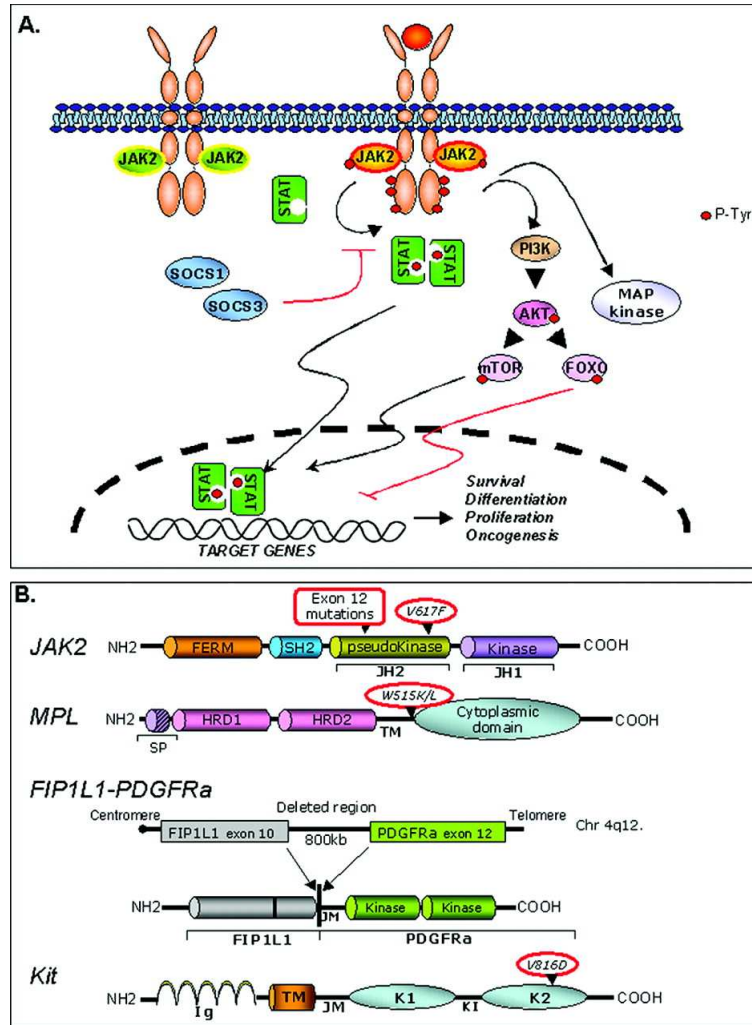
Em suma, para além da redução da apoptose, várias vias e moléculas anti-apoptóticas intracelulares como as STAT3, PI3K-AKT e MAPK-ERK são activadas/induzidas constitutivamente nos progenitores mielóides dos doentes com NMP. Simultaneamente existe hipersensibilidade para o factor de crescimento Insulina-like (IGF-1) (Kiladjian J *et al.*, 2007), o factor estimulante de colónias de granulócitos/macrófagos, a IL-3 e para o factor estimulante de colónias de megacariócitos ou Tpo. Além do referido, a JAK2 mutante promove a passagem da fase G1 para S nas células do sistema hematopoiético, acompanhada por sobre-expressão de ciclina D2 e diminuição do inibidor do ciclo celular, p27kip. Ao contrário de muitas doenças malignas em que o locus INK4a está inactivo, os progenitores eritróides dos doentes com PV exibem aumento da expressão do locus INK4A/ARF (Kota J *et al.*, 2008).

Os efeitos observados na diferenciação eritróide podem ser mediados por uma molécula importante na diferenciação eritróide, o factor nuclear eritróide-derivado 2 (NF-E2), que está sobre-expresso na PV. Além disso, como referido anteriormente, as células hematopoiéticas que expressam a JAK2V617F tornam-se hipersensíveis ao factor de

crescimento insulina-like 1 (IGF-1), sugerindo que este factor de sinalização também influencia a proliferação celular e diferenciação das células nas NMP (Campbell P *et al.*, 2006; Spivak J *et al.*, 2003).

Como já referimos anteriormente, a activação do local de ligação da JAK ao receptor conduz à indução da activação dos STATs. Um grupo de genes rapidamente induzidos pelo STATs é a família de supressores da sinalização das citocinas, os *SOCS* (figura 13). As proteínas *SOCS* ligam-se quer às JAKs quer aos resíduos de fosfotirosina do receptor activado, bloqueando a sinalização (Kaushansky K, 2005).

Assim, o *SOCS 1* e *3* são reguladores negativos da via JAK/STAT, uma vez que podem inibir a actividade catalítica das proteínas JAK directamente, por possuírem uma região inibidora das cinases (KIR) que tem como alvo a ansa de activação das proteínas JAK. A sua expressão leva à redução da fosforilação da JAK e do STAT, redução da dimerização do STAT, do importe para o núcleo e da transcrição de genes alvo. O *SOCS1* liga-se ao JAK2 fosforilado directamente, enquanto que o *SOCS3* inibe a JAK2 enquanto se liga a um receptor de citocinas como por ex. o EpoR (Fourouclas N *et al.*, 2008). A JAK2V617F parece não ser sub-regulada pelo *SOCS3*, possivelmente devido à contínua fosforilação do *SOCS3* que pode debilitar a sua actividade ligase E3. Foi proposto um modelo em que o JAK2V617F pode escapar à regulação fisiológica do *SOCS*, hiperfosforilando o *SOCS3* (Kota C *et al.*, 2008). A existência de mutações ou de metilação dos *SOCS1* e *SOCS3*, podem contribuir para a patogénese das NMP JAK2V617F positivas e negativas (Fourouclas N *et al.*, 2008).



**Figura 13.** Vias de sinalização celular e genes mutados mais frequentes nas NMP. Em **A** está representado a activação das vias de sinalização pela JAK2. A JAK2 e os outros membros da família das cinases Janus são proteínas tirosina cinase que funcionam como intermediários entre os receptores membranares e as moléculas sinalizadoras intracelulares. As proteínas JAK estão constitutivamente associadas com os domínios citoplasmáticos dos receptores. Normalmente a activação celular ocorre quando a ligação de um ligando, Epo ou Tpo, induz a dimerização do seu receptor e a sua alteração conformacional com consequente activação da JAK. Os dois receptores-associados à JAK são trazidos para a proximidade permitindo a transfosforilação um do outro. As JAKs fosforiladas e activadas, por sua vez, fosforilam os domínios citoplasmáticos dos receptores, que por esse meio se tornam locais de ligação para uma cascata de moléculas sinalizadoras, particularmente os STAT. Os STATs estão ligados a resíduos de tirosina fosforilados nos domínios citoplasmáticos dos Epo-R e Tpo-R, tornam-se eles mesmos substratos para fosforilação e activação pela JAK activada. As moléculas STAT activadas, migram para o núcleo, onde actuam como factores de transcrição ligando seqüências específicas reguladoras que activam ou reprimem a transcrição de genes alvo. **B** representa as mutações nos genes mais frequentes nas NMP, JAK2, MPL, PDGFRa/FIP1L1 e KIT (Adaptado de Vannuchi A *et al*, 2009).

### **6.3. Mutação JAK2 e complicações da PV**

O gene *JAK2* tem sido reportado nas leucemias mielóide e linfóide. Os inibidores da *JAK2*, mostraram actividade contra leucemias linfoblásticas e mielóides agudas humanas, sugerindo um papel desta cinase nestas doenças, no entanto, a transição para LMA parece não ter correlação directa com a *JAK2*, uma vez que ocorre também em casos em que esta tirosina cinase é normal (Sillero e Cañete, 2007).

É controverso se os doentes com a mutação *JAK2V617F* têm um risco aumentado de complicações vasculares. Num estudo referenciado por Hattori N *et al.* (2008), o número de megacariócitos era significativamente superior em doentes com PV com *V617F*, mas a contagem plaquetar era levemente mais baixa. Além disso, a incidência de incidentes trombóticos, embora estatisticamente não significativa, era superior no grupo portador da mutação *V617F*, mas a agregação e a adesão plaquetares não era afectada pela presença da mutação. Depreende-se que a mutação *JAK2V617F* pode ter um papel «*in vivo*» na coagulação sanguínea, não só alterando o número mas também a função de todas as três linhagens sanguíneas (Hattori N *et al.*,2008).

## **7. DIAGNÓSTICO**

### **7.1. Características Clínicas**

As NMP são altamente variáveis, apresentando fenótipos clínicos que vão sofrendo alterações durante a evolução da doença e que mimetizam outras doenças hematológicas benignas e malignas (Spivak e Silver, 2008). As principais características clínicas comuns às NMP são a sobreprodução de células sanguíneas funcionais e maduras, o curso da doença

longo (Campbell P *et al.*, 2006) e a presença de um estado de hipercoagulação (Kaushansky K., 2006). A PV, por sua vez, caracteriza-se pelo aumento da produção de eritrócitos de modo independente dos normais mecanismos que regulam a hematopoiese (Swerdlow SH *et al.*, 2008) e evolui frequentemente para “panmielose”.

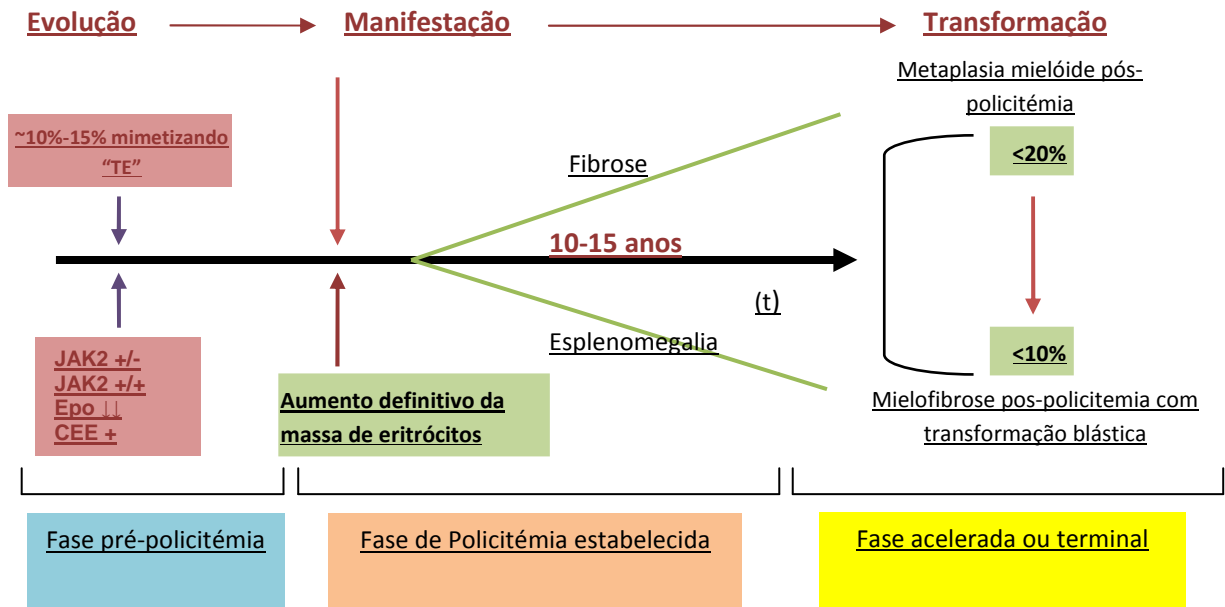
Como podemos observar na figura 14, a PV pode progredir em 3 fases: (1) Prodrômica ou fase pré-policitémica caracterizada por eritrocitose que vai de *borderline* a leve; (2) Fase de Policitemia patente, associada a massa eritrocitária significativamente aumentada; (3) Fase acelerada ou Mielofibrose pós-policitémia na qual as citopenias, incluindo a anemia, estão associadas a hematopoiese ineficaz, fibrose da medula óssea, hematopoiese extra-medular e hipersplenismo (Swerdlow SH *et al.*, 2008).

A maioria dos sinais e sintomas de PV representados na tabela 6 são consequência da eritrocitose que surge como um excesso, moderado a severo, de glóbulos vermelhos normocíticos e normocrômicos no Sp, podendo ser hipocrômicos e microcíticos nos casos de deficiência de ferro (Swerdlow SH *et al.*, 2008). A eritrocitose e o hematócrito elevado, são responsáveis pelo aumento da viscosidade sanguínea que podem contribuir para manifestações clínicas comuns como cefaleias, visão turva, alterações auditivas, hemorragias muco-cutâneas, redução da frequência respiratória e hipertensão arterial (Helmann A, 2008).

Além do referido, são também típicos de PV o prurido aquagénico, que ocorre em mais de 50% dos doentes (geralmente após um banho de água quente e que estará relacionado com a libertação de serotonina pelas plaquetas ou níveis elevados de histamina), baixo VGM e elevada contagem leucocitária (Cortes e Kantarjian, 2004; Diehn e Tefferi, 2001). A esplenomegalia presente em 2/3 dos doentes, apesar de ser critério diagnóstico *major*, à palpação tem uma sensibilidade de apenas 58% (Stuart B *et al.*, 2004). Ocorrências pouco



comuns, mas observáveis, são a dor óssea e a dermatose neutrofílica (Cortes e Kantarjian, 2004).



**Figura 14.** Representação esquemática do processo de evolução da PV. (Adaptado de Swerdlow SH et al., 2008)

O fenótipo clínico de um doente com PV pode incluir plétora e veias engorgitadas (Tefferi A, 2003) mas, actualmente, a PV é detectada precocemente não pela clínica, mas em hemogramas de rotina, que apresentam eritrocitose ou hemoglobina/hematócrito elevados (Stuart B et al., 2004).

Os valores de hemoglobina são considerados elevados acima de 18g/dl nos homens e 16g/dl na raça negra e sexo feminino; e os do hematócrito se superiores a 52% em homens de raça branca e 47% nas mulheres e raça negra (Stuart B et al., 2004). No entanto, são frequentes hemogramas com falsos negativos, uma vez que, o hematócrito não é uniforme em todos os órgãos nem nos diferentes vasos, sendo mais elevado no baço, no fígado e grandes vasos e mais baixo no intestino, rim, cérebro e microvasculatura (Spivak e Silver, 2008).

A PV acompanha-se de complicações frequentes que incluem, hemorragia, trombose, complicações vasculares e evolução para mielofibrose pós-policitémia ou LMA, que constituem as grandes causas de morbi-mortalidade nesta NMP (Vannucchi A *et al.*, 2009; Linardi C *et al.*, 2008; Ruggeri e Rodeghiero, 2008; Schafer A, 2006).

De acordo com estudos efectuados, a incidência de trombose e hemorragia na PV à apresentação, varia de 12-39% e 1,7-20%, respectivamente (Barbui e Finazzi, 2007).

**Tabela 6. Sinais e sintomas de Policitémia Vera**

<b>Mais Comuns</b>	<b>Menos Comuns</b>
Hematócrito > 52% em homens de raça branca; >47% em mulheres e raça negra	Equimoses / Epistaxis
Hemoglobina >18g/dL em homens de raça branca;>16g/dL em mulheres e raça negra.	Síndrome de Budd-Chiari
Plétora	Eritromelalgia
Prurido aquagénico	Gota
Esplenomegália	Hepatomegalia
Astenia	Isquémia digital
Perda de peso	Eventos Hemorrágicos
Diaforese	Eventos trombóticos
	Distúrbios neurológicos breves (cefaleias, tonturas, parestesias,zumbidos, visão turva)
	Dor torácica atípica

(Adaptado de Stuart B *et al.*, 2004)

Os **problemas hemorrágicos** estão normalmente relacionados com as plaquetas, envolvendo hemorragias espontâneas tipicamente muco-cutâneas, com equimoses fáceis, epistaxis e sangramento gengival (Squizzato A *et al.*, 2008). O risco de hemorragia aumenta

com o uso de fármacos antiplaquetares e, paradoxalmente ao que seria de esperar, ocorre por aumento da trombocitose, possivelmente devido a uma forma adquirida de doença de von Willebrand. No entanto, a complicação hemorrágica é menos frequente que a trombótica.

A **trombose**, por sua vez, aumenta com a idade avançada, antecedentes pessoais de trombose e factores de risco vasculares (Landolfi e Di Gennaro, 2008; Finazzi e Barbui, 2007; Schafer A, 2006). Ocorre em cerca de 40% dos doentes, geralmente sob a forma de trombose arterial na TE, e venosa na PV, podendo atingir grandes vasos, a circulação cerebrovascular, coronária e arterial periférica.

A trombose venosa, geralmente ocorre nas veias profundas das extremidades inferiores ou sob a forma de embolia pulmonar, mas pode localizar-se em zonas intra-abdominais menos frequentes como vasos mesentéricos ou hepáticos particularmente nos mais jovens (Síndrome de Budd-Chiari ou trombose da veia Porta). A localização hepática da trombose, pode ter como factores locais a hematopoiese extramedular hepática, o aumento do fluxo sanguíneo portal e a esplenomegalia congestiva. De facto há uma associação muito forte entre estas alterações hepáticas e a PV (Barbui e Finazzi, 2007; Schafer A, 2006), tendo a síndrome de Budd-Chiari sido detectada em cerca de 6% das autópsias de doentes (Cortes J *et al.*, 2004). Em 30-40% dos doentes com trombose venosa esplâncnica (síndrome de Budd-Chiari e trombose da veia porta) não atribuível a outras causas, foi detectada a mutação JAK2V617F (Kota J *et al.*, 2008), o que mais uma vez traduz a importância da genotipagem da JAK2V617F como um exame de 1ª linha nestas condições (Vannucchi A *et al.*, 2009).

Até agora não houve nenhum estudo que demonstrasse uma correlação significativa entre o número e função plaquetar e trombose mas, pelo contrário, os leucócitos foram recentemente considerados factor de risco independente de trombose (Schafer A, 2006). O

estudo referido por Schafer (2006) mostra que em doentes com leucocitose superior a  $15.000 \times 10^9 /L$ , relativamente a doentes com leucócitos inferiores a  $10.000 \times 10^9 /L$ , se observa um aumento significativo (de 70%) na taxa de complicações vasculares, em particular enfarte do miocárdio. No entanto, a activação de leucócitos *in vivo* mostrou estar associada à activação de plaquetas e células endoteliais. As anomalias qualitativas ou quantitativas dos eritrócitos também não fornecem explicação para as tendências trombóticas ou hemorrágicas nas NMP.

Além das complicações trombo-hemorrágicas referidas acima, pode ainda ocorrer trombose na microcirculação, mais comum na TE do que na PV. Clinicamente traduz-se por alterações visuais e neurológicas e eritromelalgia (dor tipo queimadura e aumento da temperatura nas extremidades distais assimetricamente) (Michiels JJ *et al.*, 2006), que pode progredir para isquémia distal e gangrena dos membros, uma vez que as arteríolas afectadas podem estar parcial ou totalmente ocluídas por trombos organizados (Michiels JJ *et al.*, 2006).

As alterações da circulação microvascular, incluindo as complicações microvasculares isquémicas tipo acidente isquémico transitório (AIT) típico ou atípico, enfartes isquémicos oculares e coronários, são manifestações clínicas específicas em doentes com PV e TE associados à trombocitémia (Michiels JJ *et al.*, 2006). Os doentes com alterações microvasculares decorrentes da trombocitémia têm sobrevida plaquetar diminuída e níveis aumentados de  $\beta$ - tromboglobulina, factor plaquetar 4 e trombomodulina e excreção urinária aumentada de tromboxano B<sub>2</sub>, indicando o envolvimento das plaquetas nestes processos *in vivo*. Além disso, a inibição da COX-1 (ciclooxigenase plaquetar) pela aspirina é seguida por alívio dos problemas microvasculares (Michiels JJ *et al.*, 2006).

Uma outra complicação da PV, muito rara mas com alta taxa de mortalidade é a compressão da espinal-medula em consequência de hematopoiese extramedular dentro do espaço epidural. Em casos suspeitos, deve fazer-se uma RM da coluna e a terapêutica que parece proporcionar um melhor prognóstico inclui uma terapia combinada de radioterapia espinal associada a laminectomia, que além de melhorar o quadro neurológico reduz a mortalidade (Scott e Poynton, 2008).

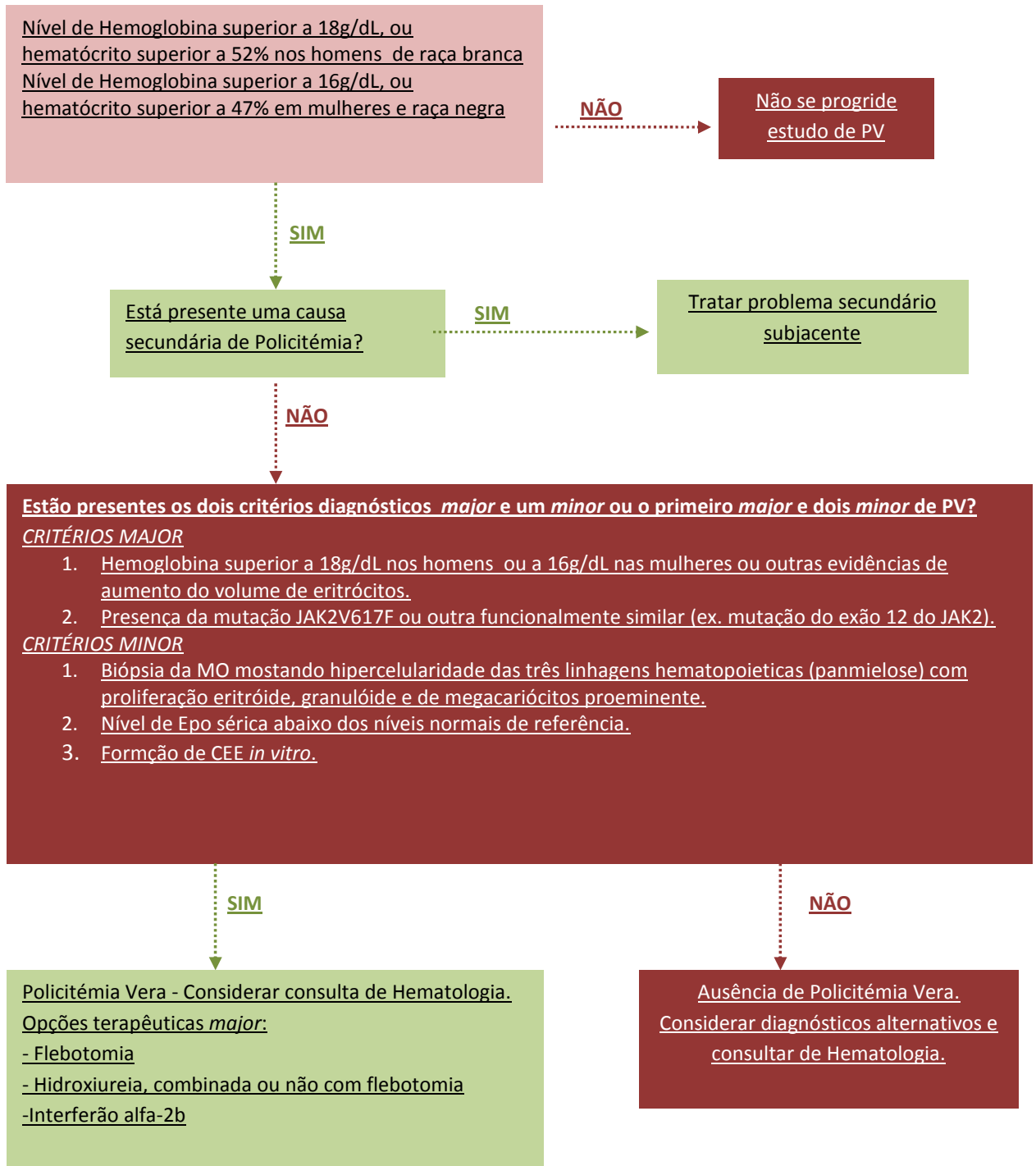
## 7.2. Diagnóstico Laboratorial

Como vimos, deve suspeitar-se de PV quando os níveis de hemoglobina e/ou o hematócrito estão aumentados contudo, o diagnóstico de PV nem sempre é fácil, sobretudo o diagnóstico diferencial com proliferação reactiva a factores não-hematológicos primários (Helmann A, 2008; Skoda R, 2007). Após exclusão de uma causa secundária de eritrocitose o diagnóstico de PV é feito através de uma combinação de critérios *major* e *minor* estabelecidos (figura 15 e tabela 6).

Foi ainda referido anteriormente que a PV, por norma, não se limita à simples proliferação de eritrócitos, revelando-se na maioria dos casos por panmielose com envolvimento das linhagens mielóide, eritróide e megacariocítica. Foi detectada a presença de uma mutação nos progenitores de cada uma destas linhagens em doentes com PV (Levine e Werning , 2006).

A maioria dos doentes com PV tem CEE espontâneas, níveis de Epo sérica baixos ou normais, sobre-expressão da proteína PRV-1, a mutação JAK2V617F (Michiels JJ *et al.*, 2007) e acumulação de eritrócitos no sangue por alteração da linhagem eritróide (Linardi C *et al.*, 2008). Porém, um doente com o PV pode ter níveis baixos de saturação de oxigênio, pois é

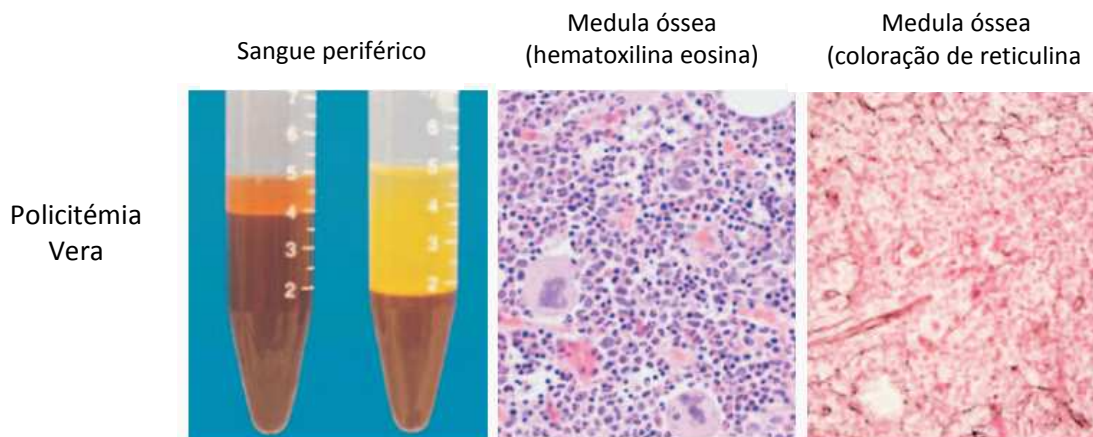
possível ter PV e uma doença hipóxica não relacionada (Schafer A, 2006; Stuart B *et al.*, 2004).



**Figura 15.** Algoritmo de avaliação e orientação na PV. (Adaptado de Swerdlow SH *et al.*, 2008; Stuart B *et al.*, 2004).

A MO mostra hipercelularidade generalizada muitas vezes marcada por um aumento dos megacariócitos, com formação de agregados, particularmente no caso de excesso de plaquetas. Apresentam anomalias morfológicas características tais como núcleos hiperlobados, e diminuição das reservas de ferro (Tefferi A, 2003; Swerdlow SH *et al.*,2008) como se pode ver na *figura 16*. Em aproximadamente 10 a 20% dos casos de PV, ocorre desenvolvimento gradual de anemia marcada. No entanto, a eritropoiese é normoblástica e a granulopoiese é morfológicamente normal (Swerdlow SH *et al.*,2008). Observa-se ainda neoangiogénese na medula óssea que não se relaciona com a baixa concentração de oxigénio medular, uma vez que este é habitualmente normal (*figura 16*) (Kaushansky K, 2005).

O esfregaço de Sp é tipicamente «leuco-eritroblástico» (*Figura 16*). Nestes casos, a MO mostra notável fibrose e o baço aumento de actividade (Dameshek W, 1951). Neutrofilia e raramente basofilia podem estar presentes, podendo ser detectados granulócitos imaturos ocasionais. Contudo, não se observa aumento da percentagem de mieloblastos na MO nem no Sp.



**Figura 16. Características laboratoriais da PV.** A PV caracteriza-se por aumento do hematócrito no sangue periférico (tubo da esquerda), medula hipercelular com aumento das células precursoras eritróides, megacariocíticas e granulocíticas (esfregaço do meio) e um aumento variável das fibras de reticulina (esfregaço da direita) (Adaptado de Campbell *et al.*, 2006).

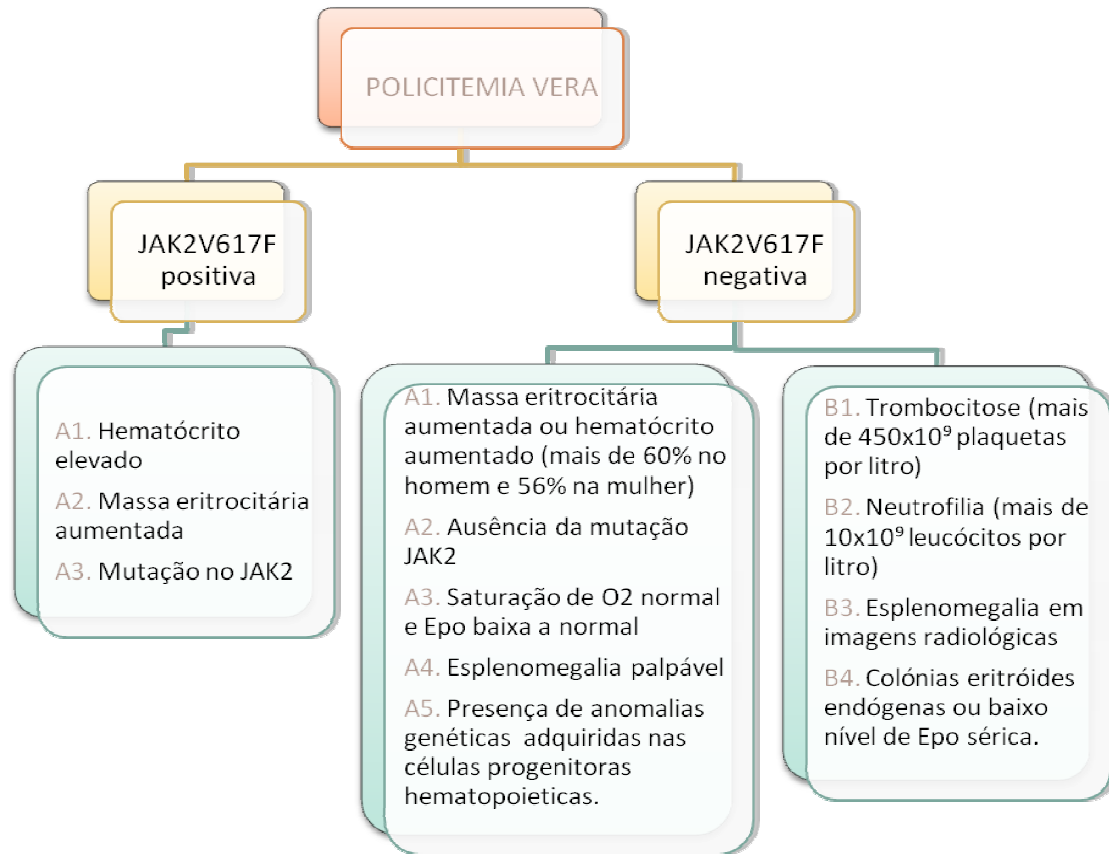
Como referido anteriormente, a maioria dos doentes com PV apresenta colónias eritróides Epo-independentes (Kota C *et al.*, 2008). Além disso, os valores de Epo plasmática nos doentes com PV apresentam-se geralmente muito baixos ou inapropriadamente normais e a excessiva proliferação de BFU-E e CFU-E independente de EPO leva ao aumento da massa de eritrócitos. Alguns doentes com PV recorrente apresentam mutações no receptor da Epo (Kaushansky K, 2005).

Os testes existentes actualmente para o diagnóstico de PV incluem: determinação da massa eritrocitária, identificação de colónias eritróides independentes de Epo *in vitro*, as análises de citogenética das células da medula óssea, determinação dos níveis de Epo, PRV-1 (Campbell P *et al.*, 2006). No entanto, a observação de que mais de 90% dos doentes com PV são portadores da mutação JAK2V617F, deu suporte à incorporação da determinação da mutação no Sp na avaliação inicial de todos os doentes com PV (Barbui e Finazzi, 2007; Baxter E *et al.*, 2005).

Recentemente, começam a estar disponíveis ensaios para determinação da mutação V617F que prometem simplificar o diagnóstico. Uma vez que a mutação JAK2V617F não é acompanhada por uma anomalia cromossómica, a técnica de FISH não pode ser usada para a detecção desta alteração (Keersmaecker e Cools, 2006). A análise de sequenciação do exão contendo a mutação V617F tem sido realizada recorrendo a testes como a PCR alelo-específica (Baxter E *et al.*, 2005), pirosequenciação, análise por digestão enzimática (RFLP, utilizando a enzima de restrição BsaXI), PCR em tempo real e análise de curva de fusão. Todos são suficientemente sensíveis para detectar a presença de uma mutação heterozigótica num pequeno número de células (5-10%) (Tefferi A, 2006). Estas análises têm poucos falsos positivos (Campbell P *et al.*, 2006), demonstrando que a maioria dos doentes são portadores



desta mutação (Keersmaecker and Cools, 2006), o que as torna ferramentas diagnósticas úteis (Campbell P *et al.*, 2006).



**Figura 17. Critérios de diagnóstico propostos para a PV JAK2V617F positiva e negativa.** No caso de JAK2V617F-positiva, são suficientes para o diagnóstico dois critérios A. No caso de PV negativa para a mutação, o diagnóstico requer os critérios A1, A2 e A3, mais outro critério A ou dois B (Baseado em Campbell P *et al.*, 2006; Stuart B *et al.*, 2004).

A mutação do gene JAK2 não está relacionada com outras causas de eritrocitose absoluta que não a PV (Campbell P *et al.*, 2006). Por consequência, na ausência de eritrocitose secundária coexistente, a presença da mutação do JAK2 num doente com uma massa eritrocitária aumentada é suficiente para o diagnóstico de PV (figura 17). Nesta situação, o papel da análise da massa eritrocitária é fundamentalmente para distinguir entre PV e TE o que, dadas as similaridades clínicas e biológicas entre as duas condições, torna

difícil o diagnóstico diferencial. De facto, não só os níveis de Epo não distinguem entre PV e TE V617F-positiva, como estudos citogenéticos em doentes com a mutação JAK2 também não adicionam informação diagnóstica ou prognóstica útil (Campbell P *et al.*, 2006).

Nos casos de PV JAK2V617F-negativa, que representa menos 5% de todos os casos, a eritrocitose aparente deve ser excluída pela análise da massa eritrocitária e a eritrocitose secundária pela mensuração dos níveis de Epo e da saturação de oxigénio. As alterações citogenéticas ou a evidência imagiológica de esplenomegália deverão suportar o diagnóstico de NMP (Campbell P *et al.*, 2006).

A genotipagem molecular e os testes para detecção das mutações dos genes JAK2 ou MPL são cada vez mais importantes no diagnóstico das NMPs (Girodon F *et al.*, 2008). A detecção de uma destas mutações, estabelece inequivocamente por si só a presença de uma NMP clonal e exclui a possibilidade de eritrocitose, trombocitose ou mielofibrose reactivas. Infelizmente, as mutações não ajudam a distinguir as diferentes formas de NMP. No entanto, ainda não foram detectadas mutações no exão 12 do gene JAK2 noutra doença que não a PV, e a mutação MPL nunca foi reportada nestes doentes (Vannucchi A *et al.*, 2009; Kralovics R, 2008).

Assim, em doentes com eritrocitose, de acordo com os critérios da OMS de 2008, a demonstração da mutação JAK2V617F faz diagnóstico de PV, em mais de 95% dos casos e, nos restantes doentes, menos de 2%, é portador de anomalias do exão 12 do JAK2. No entanto, a maioria dos doentes com mutação no exão 12 do gene JAK2 tem primariamente um fenótipo de eritrocitose em contraste com a panmielose típica da mutação JAK2V617F (Williams D *et al.*, 2007).

Nos doentes com PV e TE, a quantidade de alelos V617F nos granulócitos foi positivamente associada ao nível de hemoglobina e contagem leucocitária e inversamente à contagem plaquetar. Além disso, quanto mais alta é a carga alélica mutada, mais elevado é o risco de apresentação de prurido aquagénico, de desenvolver esplenomegalia ou sofrer eventos cardiovasculares, e da necessidade de instituir terapêutica citotóxica (Guglielmelli P *et al.*, 2008)

Assim, têm sido propostos e usados novos critérios de diagnóstico como representado na figura 17. No caso concreto do diagnóstico de PV, 2 critérios *major* devem ser preenchidos: níveis de hemoglobina superiores a 18,5g/dl no homem e 16,5mg/dl na mulher ou eritrocitose e a presença da mutação no gene JAK2, V617F, ou outra funcionalmente similar. Quando a mutação JAK2 está ausente, 2 critérios *minor* devem ser preenchidos; alta celularidade com proliferação acentuada das linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica no estudo histológico de biópsia de MO e a demonstração de aumento de colónias eritróides sem adição de Epo à cultura (Helmann A, 2008).

A abordagem diagnóstica combina então a citomorfologia (em esfregaços de Sp, aspirados de MO com histologia dos mesmos e biópsias aspirativas) com a citogenética (Haferlach T, 2008) e, mais recentemente com os estudos de biologia molecular para análise da mutação JAK2V617F. Este novo marcador é muito útil para confirmação de NMP BCR/ABL-negativas (Haferlach T, 2008).

A citomorfologia e histologia da MO mostra aumento da celularidade com proliferação celular das três linhagens, megacariopoiese, granulopoiese e eritropoiese, ferro marcadamente deficiente em muitos casos, hiperplasia sinusóide e mielofibrose variável em combinação com osteopenia e contagem celular no sangue periférico elevada (Haferlach A,

2008). Em adição, outros critérios como concentração de Epo sérica baixa ou a formação de CEE *in vitro* são incluídas nos critérios diagnósticos (Haferlach A, 2008). A presença de anomalias do cariótipo ocorrem em cerca de 33-35% ao diagnóstico e, per se, parecem de mau prognóstico (Haferlach A, 2008).

A pesquisa da mutação JAK2V617F, de PRV-1, os níveis de Epo sérica, a formação de CEE, os níveis de fosfatase alcalina leucocitária, as características morfológicas nos esfregaços de Sp e a histopatologia da MO têm alta sensibilidade e especificidade (quase 100%) para diagnosticar PV JAK2V617 quer positivas quer negativas (Michiels JJ *et al.*, 2007). No entanto, critérios *minor* como a fosfatase alcalina dos leucócitos (FAL) já referida, a vitamina B12 sérica e a capacidade de ligação à vitamina B12 entraram em desuso, por frequentes erros laboratoriais e dificuldades técnicas (Stuart BJ *et al.*, 2004).

## **8. TRATAMENTO**

Não existem tratamentos médicos curativos para a PV, com excepção da transplantação da medula óssea usada excepcionalmente em doentes mais jovens.

O tratamento tem como objectivos prevenir, prolongar a sobrevida, reduzir os sintomas e o risco de complicações (*figura 18*) (Linardi C *et al.*, 2008; Cortes e Kantarjian, 2004). Para tal, os doentes devem ser estratificados em alto e baixo risco e o tratamento apropriado deve ser instituído precocemente, como se pode ver *nas tabelas 7 e 8* (Landolfi e Gennaro, 2008; Mesa R, 2007).

**Tabela 7. Tratamento da PV de acordo com o grupo de risco**

Score	Categoria de risco	Plano de actuação
< 1	<b>Baixo risco</b>	Baixa dose de aspirina. Flebotomia com o objectivo de reduzir o hematócrito para menos de 45% ou menos, de acordo com o género e a raça.
1-3	<b>Risco Intermédio</b>	Terapêutica individualizada para cada caso, possivelmente flebotomia associado a agentes que actuem no número/função plaquetares (aspirina, anagrelide).
>3	<b>Alto e muito alto risco</b>	Baixa dose de aspirina. Agente mielossupressor com preferência a hidroxiureia ou Interferão- $\alpha$ suplementado com flebotomia.

Adaptado de Landolfi e Di Gennaro, 2008; Mesa R, 2007; Tefferi A, 2006; Stuart B et al., 2004 .

**Tabela 8. Sistema de Score para o risco de trombose.**

Factor de risco	Score
Idade < 40	0
40-55	1
56-65	2.5
>65	3.5
Hipertensão	0,5
Dislipidémia	0,5
Contagem plaquetar ( $>1000 \times 10^9/L$ )	1
Contagem de leucócitos ( $>12 \times 10^9/L$ )	1
Hábitos tabágicos	1.5
Diabetes	1,5
História de trombose	3.5

(Adaptado de Landolfi and Di Gennaro, 2008)

A mortalidade que surge na idade mais avançada, resulta da interacção entre as causas associadas ao processo natural da idade e as inerentes à PV. Mas, uma vez a doença bem controlada, a sobrevida não é diferente da população controlo (Rozman C *et al.*, 1991). Actualmente, as recomendações para o tratamento de PV, devem ser adaptadas ao risco de desenvolver trombose no doente em causa (Barbui e Finazzi, 2007).

Assim, o tratamento dos doentes com PV depende do estadio da doença e das complicações da mesma, nomeadamente se estas colocam ou não a vida do doente em perigo. Entre as primeiras é de salientar o aumento do hematócrito, as complicações vasculares/trombose, e a evolução clonal para MFP e LMA. As complicações menos graves incluem sintomas constitucionais, distúrbios microvasculares e prurido aquagénico (Tefferi A, 2003). Segundo um estudo prospectivo, uma das complicações mais graves da PV é a trombose, que ocorre em cerca de 50% dos doentes (Stefano V *et al.*, 2008), apresentando recorrências geralmente no território vascular afectado pelo evento inaugural (Stefano V *et al.*, 2008).

Muitos estudos têm procurado investigar o papel da JAK2V617F na trombose (Stefano V *et al.*, 2008). Um desses estudos analisou várias variáveis como a idade, a contagem de leucócitos e de plaquetas e as opções terapêuticas. O resultado da análise multivariada das variáveis do estudo indicou que a razão JAK2V617F/JAK2 normal se comporta como um factor de risco independente para complicações vasculares *major* (Barbui and Finazzi, 2007).

Apesar de não haver estudos comprovativos, assume-se que factores de risco comuns de aterosclerose como a HTA, a dislipidémia, a diabetes e o tabagismo devam ser tidos em conta (Finazzi e Barbui, 2007). No entanto, as recomendações de tratamento na PV não

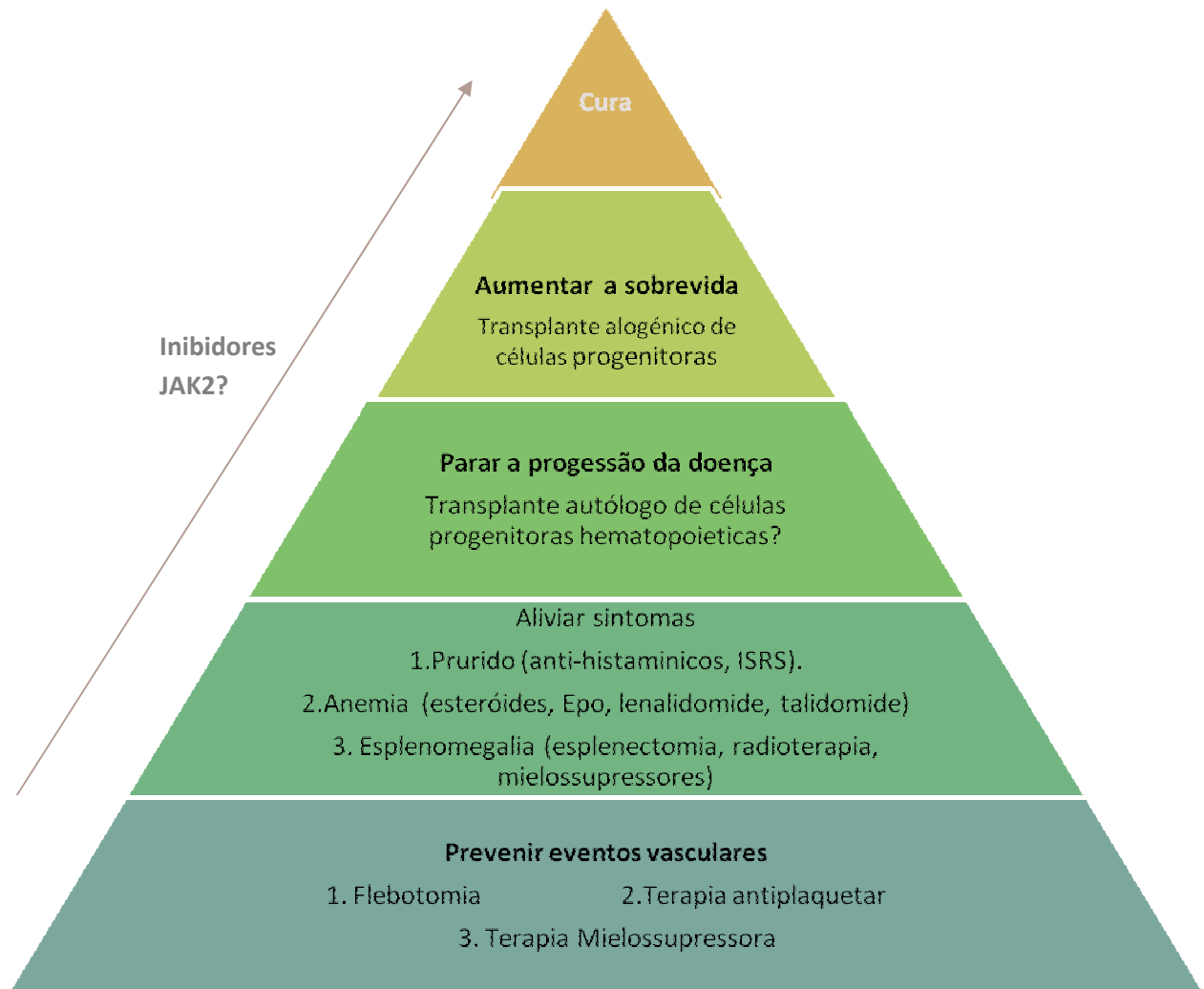
incluem especificamente a intervenção nestes parâmetros porque, teoricamente, estas medidas aplicam-se uniformemente a todos os doentes (Landolfi e Gennaro, 2008).

Assim, o objectivo terapêutico primordial é prevenir complicações trombóticas sem aumentar o risco de outros eventos como hemorragia, transformação em fibrose medular ou em LMA (Mesa R, 2007). Deste modo, a redução do hematócrito é um dos objectivos da terapêutica. Apesar de não haver um estudo específico que nos permita concluir concisamente qual o limite que se pretende obter, um largo estudo prospectivo de coorte com multivariáveis permitiu estabelecer como meta de hematócrito valores de 0,45 a 0,55 (45-55%) (Barbui e Finazzi, 2007).

Neste sentido, o tratamento de primeira linha, tendo em vista o objectivo primordial, é actualmente a flebotomia regular, que ajudará a manter o hematócrito em níveis adequados (Schafer A, 2006; Stuart B *et al.*, 2004). No entanto, é um procedimento limitado, uma vez que isoladamente pode provocar trombose, deficiências de ferro e exacerbar a trombocitose. Deste modo, a flebotomia está sobretudo indicada em doentes jovens, sem história de trombose, e com uma contagem de plaquetas próxima do normal. Os fármacos supressores tumorais têm um papel suplementar (Steensma e Tefferi, 2003).

No primeiro estudo clínico efectuado pelo PVSG foram randomizados 431 doentes para 1 dos seguintes tratamentos: a) flebotomia isolada; b) radiofosforo ( $^{32}\text{P}$ ) associado a flebotomia; c) Clorambucil associado a flebotomia. Os resultados obtidos mostraram que, os doentes tratados apenas com flebotomia, tiveram uma melhor sobrevida mediana (13,9 anos) do que aqueles que usaram também  $^{32}\text{P}$  (11,8anos) ou clorambucil (8,9 anos). As causas de morte foram diferentes nos 3 grupos: a mortalidade nos primeiros 2-4 anos dos doentes flebotomizados foi, principalmente por complicações trombóticas, enquanto os que usaram os

dois mielossupressores foi por leucemia aguda e outras doenças malignas secundárias. Sendo assim, a flebotomia é recomendada em todos os doentes com PV e deve representar o único tratamento citorredutivo em doentes com baixo risco de complicações vasculares (Barbui e Finazzi, 2007; Tefferi A, 2003).



**Figura 18.** Objectivos do tratamento da PV. (Adaptado de Mesa et al., 2007)

Além da prevenção de eventos vasculares, o tratamento da PV inclui tratamento paliativo, paragem da progressão da doença, aumento da sobrevida e eventualmente cura (figura 18).



## **8.1. Prevenção dos problemas vasculares na PV**

Para a prevenção dos problemas vasculares na PV recorre-se à flebotomia, antiagregantes plaquetares e mielossuppressores.

### **8.1.1. Flebotomia**

A flebotomia, o *gold standard* do tratamento da PV (Gaikwad e Prchal, 2007), deve ser começada retirando 250-500cc de sangue diariamente ou de 2 em 2 dias, até o hematócrito estar entre 0,40 e 0,45 (Mesa R, 2007; Poullin e Lefèvre, 2008). Nos doentes mais idosos ou naqueles com doença cardiovascular, deve ser retirada uma menor quantidade de sangue (200-300cc 2x/semana). Uma vez normalizado o valor de hematócrito, devem ser realizados hemogramas regularmente (todas as 4-8 semanas) que vão estabelecer a frequência de novas flebotomias. Não deve ser feita terapêutica suplementar com ferro (Barbui e Finazzi, 2007), pois uma concentração de ferro baixa vai ter um efeito positivo no sentido de limitar a eritropoiese. Paradoxalmente, ao proporcionar uma deficiência severa e prolongada deste elemento pode surgir/agravar a astenia e outros efeitos adversos indesejáveis (Vannucchi A *et al.*, 2009).

Contudo, a flebotomia não reduz o risco de transformação leucémica (Gaikwad e Prchal, 2007), mas pode reduzir o risco de complicações trombo-embólicas (Tefferi A, 2003). No entanto, para o tratamento de doentes de baixo risco e portadores de risco cardiovascular bem controlado, a flebotomia é ideal (Finazzi e Barbui, 2007) não sendo geralmente aconselhado o uso de mielossuppressores.

### 8.1.2. Anti-agregantes plaquetares

Os anti-agregantes plaquetares em baixa dose (preferencialmente a Aspirina na dose 75-100mg/dia), são aconselhados em todos os doentes com PV que não tenham contra-indicações evidentes (Squizzato A *et al.*, 2008; Barbui e Finazzi, 2007).

Os defeitos pró-hemorrágicos plaquetares na PV incluem baixa agregação plaquetar em resposta a vários agonistas plaquetares incluindo trombina, ADP, epinefrina, colagénio, tromboxano A<sub>2</sub> e factor activador das plaquetas; valores intraplaquetares anormalmente baixos de nucleotídeos adenina e serotonina; reduzida actividade plaquetar do factor activador X; peroxidação lipídica plaquetar anormal; ligação comprometida ao fibrinogénio como resultado de diminuição da expressão de GP IIb/IIIa; e doença de von Willebrand adquirida, (em mais de um terço dos doentes) (Tefferi A, 2003).

Apesar de actuar na redução da síntese de tromboxano vasoactivo A<sub>2</sub> pelas plaquetas (Tefferi A, 2003), cuja biossíntese aumenta na PV, o efeito da aspirina é modesto na diminuição de complicações trombóticas (Gaikwad e Prchal, 2007; Squizzato A *et al.*, 2008) e este fármaco em altas doses está contra-indicado. Em baixas doses é eficaz e seguro no alívio de sintomas microvasculares como eritromelalgia e distúrbios neurológicos como disartia, hemiparésia, escotomas cintilantes, amaurose fugaz e migraine (Mesa R, 2007; Finazzi e Barbui, 2007; Michiels JJ *et al.*, 2006; Tefferi A, 2003).

A prevenção de eventos trombóticos também pode passar por uma associação de clopidogrel, na síndrome coronária aguda, ou dipiridamol depois de um AVC isquémico ou AITs, que pode ser benéfico nos 3-4 anos após o evento trombótico (Landolfi e Gennaro, 2008). O clopidogrel pensa-se que actue na redução dos parâmetros de activação leucocitária (Landolfi e Gennaro, 2008).

### 8.1.3. Mielossupressores

Os fármacos mielossupressores podem reduzir a taxa de trombose, mas há consenso de que o seu uso aumenta o risco de transformação em leucemia aguda e SMD (Barbui e Finazzi, 2007; Gaikwad e Prchal, 2007). Estes fármacos incluem a Hidroxiureia, o Interferão alfa, o Anagrelide, o Bussulfano, o Pipobroman, P<sup>32</sup> e o Clorambucil.

#### Hidroxiureia (HU)

A HU inibe a ribonucleotido reductase prevenindo a síntese de ADN (Sillero e Cañete, 2007) e impede a reparação do ADN (Burkitt e Raafat, 2006) danificado por exemplo agentes químicos e radiação. A dose inicial é de cerca de 15mg/kg/dia até ser obtida resposta; depois, é administrada numa dose de manutenção diária de cerca de 0,5 a 1g que tem a função de manter o hematócrito sem reduzir a contagem leucocitária abaixo de  $3 \times 10^{12}$  e que geralmente demonstra capacidade de reduzir o risco de trombose (Gaikwad e Prchal, 2007). Notavelmente, o efeito anti-trombótico da HU pode ocorrer por mecanismos de acção adicionais além da pan-mielossupressão, incluindo alterações qualitativas nos leucócitos, a diminuição da adesão molecular endotelial e o aumento da formação de óxido nítrico (Barbui e Finazzi, 2007).

A HU é o fármaco de primeira linha mais usado na PV (Linardi C *et al.*, 2008) e associado a flebotomia, é o procedimento de eleição nos doentes estratificados como alto risco (*tabela 7*) (Vannucchi A *et al.*, 2009; Rickesten A *et al.*, 2008; Barbui e Finazzi, 2007; Mesa R, 2007). Os efeitos adversos mais comuns deste fármaco são a falência hematopoiética, levando a neutropenia e anemia macrocítica; úlceras orais e lesões da pele; alterações gastrointestinais e risco de evolução para leucemia (Sillero e Cañete, 2007).

Num estudo comparativo entre HU e apenas flebotomia, não houve diferenças significativas entre os grupos, no entanto, doentes tratados com HU tiveram mais tendência para a leucemia aguda (9,8 vs 3,7%), menos para a mielofibrose (7,8 vs 12,7%) e menor mortalidade (39,2 vs 55,2%) (Barbui e Finazzi, 2007). Contudo, o risco de transformação em leucemia em doentes a tomar HU é controverso; alguns estudos clínicos sugeriram que a HU apresenta baixo risco (que varia de 1-10%) considerando a possibilidade de que a propensão de transformação leucémica poderia ser apenas resultante da natural progressão da doença (Linardi C *et al.*, 2008; Finazzi e Barbui, 2007 ; Burkitt e Raafat, 2006).

Após a descoberta da mutação JAK2V617F, verificou-se que os doentes tratados com HU, apresentavam diminuição da carga mutante relativamente aos doentes com PV ao diagnóstico, e que essa redução ocorria preferencialmente nos primeiros anos de tratamento e era mais significativa nas mulheres. Isto veio reforçar a importância da determinação da mutação JAK2V617F no diagnóstico prévio ao tratamento (Girodon F *et al.*, 2008).

### **Pipobroman**

O Pipobroman é um agente alquilante derivado da piperazina com um mecanismo de acção que envolve competição metabólica com bases pirimidínicas. É administrado na dose de 1mg/kg/dia até ser obtida resposta hematológica, e numa dose de 0,3-0,6mg/kg/dia como terapêutica de manutenção. Alguns estudos têm demonstrado que este fármaco tem risco de transformação em leucemia similar à HU categorizando-o também como mielossupressor de 1ª linha (Burkitt e Raafat, 2006). É um fármaco com baixa toxicidade, eficiente no controlo da PV a longo prazo, actuando ainda no controlo da contagem plaquetar e na inibição da libertação de citocinas fibrogénicas (Passamonti F *et al.*, 2000).

## Interferão

O Interferão (INF), evidencia uma variedade de propriedades biológicas que incluem imunomodulação, indução da apoptose e inibição da angiogénese (Kiladjian JJ *et al.*, 2008). A acção do INF- $\alpha$  nos clones das NMPs é incerta (Levine e Gilliland, 2008), contudo sabe-se que suprime a proliferação dos progenitores hematopoiéticos, que tem um efeito inibitório directo nas células progenitoras dos fibroblastos da MO e que antagoniza a acção do factor de crescimento derivado das plaquetas, do factor de crescimento transformador  $\beta$  e de outras citocinas que podem estar envolvidas no desenvolvimento de mielofibrose (Barbui e Finazzi, 2007; Spivak J *et al.*, 2003). Além disso, pode ainda controlar a eritrocitose, a trombocitose e o hematócrito na maior parte dos doentes que conseguem tolerar a dose necessária, ou seja de 4,7 a 27 milhões de unidades por semana. Na PV, o INF- $\alpha$  induz até 80% de respostas hematológicas, tem um efeito benéfico na trombocitose e é capaz de diminuir a esplenomegalia, aliviar o prurido intratável e outros sintomas constitucionais (Kiladjian JJ *et al.*, 2008). Deve ser administrado na dose de 3 milhões de unidades por dia, até ser atingida resposta hematológica (hematócrito abaixo de 0,45), para posteriormente, em terapêutica de manutenção, se proceder ao ajuste da dose mínima semanal necessária para controlar o hematócrito (Finazzi e Barbui, 2007).

O maior problema do INF- $\alpha$ , além do preço elevado e da via de administração parenteral, é a incidência de efeitos adversos. Pelo menos em 1/3 dos doentes a terapêutica é descontinuada devido aos efeitos secundários, entre os quais, síndrome tipo gripe, mialgias, fadiga, mal-estar, febre e artralgias que geralmente aparecem 1-3h após administração e desaparecem horas depois. Sinais de intoxicação crónica tais como fraqueza, mialgias, perda de peso e de cabelo, depressão severa e outros sintomas psicológicos, alteração da função

tiróideia, sintomas gastrointestinais e cardiovasculares também obrigam a descontinuar a terapêutica. (Finazzi e Barbui, 2007).

Uma das maiores vantagens deste fármaco é não induzir transformação leucémica nem ser teratogénico (Vannucchi A *et al.*, 2009; Kiladjian JJ *et al.*, 2008; Spivak J *et al.*, 2003) mas, devido ao seu elevado custo e toxicidade, deve ser reservado para categorias seleccionadas de doentes tal como mulheres grávidas, pessoas muito jovens ou doentes com intolerância à HU ou prurido intratável (Kiladjian JJ *et al.*, 2008; Finazzi e Barbui, 2007). Por exemplo, em grávidas de alto risco que requerem tratamento mielossupressor, o fármaco de escolha é o INF- $\alpha$ , no entanto, salienta-se que durante o 1º Trimestre, durante a organogénese, qualquer mielossupressor deve ser evitado (Vannucchi A *et al.*, 2009; Barbui e Finazzi, 2006).

A descoberta da forma peguilada deste mielossupressor, veio trazer alguns benefícios, como o aumento da semi-vida plasmática, o que permite aumentar o intervalo entre doses (para semanalmente) (Kiladjian JJ *et al.*, 2008; Jabbour E *et al.*, 2007). Além disso, o interferão peguilado- $\alpha$ -2b induz a normalização dos níveis elevados de PRV-1 (Tutaeva V *et al.*, 2007), a reversão de anomalias cromossómicas, o restabelecimento da hematopoiese policlonal, a supressão do crescimento de colónias eritróides independentes da Epo, e a diminuição da percentagem de células circulantes com a mutação JAK2V617F (Rickesten *et al.*, 2008; Samuelsson e Mutschler, 2006). Além disso, reprime directamente a megacariopoiese através da inibição do receptor de sinalização da Mpl induzida pela Tpo e diminui a capacidade de transformação em mielofibrose (Kiladjian JJ *et al.*, 2008).

## **Anagrelide**

O anagrelide é um fármaco de administração oral que pertence ao grupo das imidazol quinazolidionas. Diminui a produção plaquetar, interfere com a maturação megacariocítica, e em altas doses pode ainda inibir a agregação plaquetar e induzir supressão eritrocitária discreta. Mais de 80% dos doentes com trombocitose experimentam uma redução da contagem plaquetar com este fármaco. É uma boa escolha nos doentes com trombocitose e alto risco de hemorragia. No entanto, em doentes JAK2V617F-positivos observou-se que a hidroxiureia proporcionou maior citorredução e menor taxa de trombose arterial comparativamente ao anagrelide (Stefano V *et al.*, 2008).

Os principais efeitos adversos incluem palpitações, cefaleias, diarreia e menos frequentemente insuficiência cardíaca (Vannucchi A *et al.*, 2009; Steurer M *et al.*, 2004). Além disso, num estudo referenciado por Steurer M *et al.* (2004), observou-se numa grande percentagem de doentes que receberam uma combinação de anagrelide e AAS em baixa dose, maior predisposição para hemorragia.

Os fármacos alquilantes, **Clorambucil**, **Bussulfano** e  $^{32}\text{P}$ , estão actualmente em desuso devido à possibilidade de leucemia iatrogénica.

## **8.2. Tratamento Paliativo**

O tratamento paliativo pode incluir o tratamento do prurido, da eritromelalgia, da astenia e da esplenomegália dolorosa.

Para o tratamento do prurido utiliza-se normalmente anti-histamínicos e inibidores da recaptção da serotonina (ISRS), para a eritromelalgia aspirina e para a astenia não existe terapêutica específica. Os anti-histamínicos de maior utilidade são a Hidroxizina e

Difenidramina. Quanto aos ISRS, são eficientes como tratamento de primeira linha em casos de prurido refractário e recorre-se geralmente à Paroxetina (Tefferi A, 2003; Diehn e Tefferi, 2001). O IFN $\alpha$  também oferece alívio do prurido, mas tem toxicidade elevada.

Na redução da esplenomegalia dolorosa, a HU e a Cladribina, poderão ter algum efeito (Mesa R, 2007). A Esplenectomia apesar de eficaz e definitiva, apresenta problemas indiscutíveis que a tornam o último recurso, sendo de salientar a mortalidade elevada como qualquer cirurgia *major*; a trombose esplénica, mesentérica ou portal (6-7% dos casos); hemorragias; hipertensão portal e hepatomegália (Sillero e Cañete, 2007).

### **8.3. Transplante de medula**

O **transplante alogénico de células progenitoras hematopoiéticas** é a única terapêutica potencialmente curativa, capaz de aumentar a sobrevida ou de alterar a história natural da doença, conseguindo em alguns casos erradicar o clone eritróide maligno. No entanto, existe um grande risco de rejeição por doença de enxerto-*versus*-hospedeiro (33% dos casos) (Mesa R, 2007), elevada toxicidade e mortalidade.

Deste modo, o transplante de medula é geralmente reservado a doentes na fase de aceleração, jovens, doentes refractários ao tratamento, com múltiplas complicações trombohemorrágicas ou com progressão acelerada para MFP (Sillero e Cañete, 2007).

Num estudo efectuado num doente JAK2V617F-negativo submetido a transplante alogénico em que o dador era JAK2V617F-positivo, sem historial de NMP, mas que já tinha tido episódio de trombose venosa esplâncnica verificou-se que imediatamente após o transplante a carga de alelos JAK2V617F aumentou no receptor, mas com o tempo houve remissão dos clones JAK2V617F-positivos. Estes dados sugerem que, apesar da mutação



JAK2V617F poder ocorrer numa célula progenitora hematopoiética, pelo menos nos transplantes estas células progenitoras não tem vantagem proliferativa (Kota J *et al.*, 2008).

#### **8.4. Novos fármacos dirigidos a alvos moleculares - Os inibidores das tirosina cinases**

O conhecimento mais aprofundado sobre a patogénese molecular das NMP, permitiu o desenvolvimento de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares, em particular inibidores da transdução de sinal dirigidos a proteínas tirosina cinase específicas com relevância no tratamento das NMPs (Cortes e Kantarjian, 2004).

Um dos primeiros inibidores de tirosina-cinases aprovados pela FDA foi o Imatinib, para tratamento da LMC. O **Imatinib** é um potente e selectivo inibidor das tirosina cinases c-ABL, BCR/ABL, c-KIT e PDGFR, com actividade *in vitro* comprovada (Gaikwad e Prchal, 2007; Cortes e Kantarjian, 2004; Silver RT, 2003; Spivak J *et al.*, 2003), que tem sido testado em doentes com a mutação da JAK2. Num grupo de doentes com PV em que se utilizaram doses superiores a 800mg/dia foi eficaz na diminuição da necessidade de flebotomias (Barbui e Finazzi, 2007), tendo tido um efeito terapêutico moderadamente desejável (Gaikwad e Prchal, 2007).

Outro grupo de fármacos em estudo são os **inibidores das citocinas imunomoduladoras e agentes anti-angiogénicos (IMIDs)**, como a **lenalidomida** e a **pomalidomida**, que tem mostrado ser potenciais armas terapêuticas nas NMPs, especificamente na mielofibrose-pós PV (Mesa R, 2007).

A descoberta da proteína JAK2 e da mutação JAK2V617F, está a reestruturar a forma de tratamento das NMP (Campbell P *et al.*, 2006), tendo sido desenvolvidos vários **inibidores**

**selectivos da JAK2.** Estes inibidores não discriminam entre a proteína JAK2 normal e a JAK2 mutante, mas mostram especificidade para a JAK2 quando comparados com as JAK1, JAK3, Tyk2 e outras PTK (Kota J *et al.*, 2008).

Actualmente, estão em estudo vários inibidores da JAK como o **Lestaurinib, XL-019, INCB018424, AZ-01, CEP-701, AT9283, TG101348** (Vannucchi A *et al.*, 2009; James C, 2008; Pesu e Laurence, 2008), e outros inibidores de TK (TKI) como o **AMN107** ou **nilotinib** (potente inibidor da tirosina cinase Abl com pouca eficácia na PV) e o **AEE788** (inibidor do EGFR e VEGFR, e das cinases MAPK e ATK) (Gaikwad e Prchal, 2007).

Um ensaio clínico efectuado com INCB018424 evidenciou que os doentes, independentemente da presença da mutação de JAK2, apresentavam diminuição da esplenomegalia, normalização da leucocitose/trombocitose e melhoria sintomática. Além disso mostraram ainda redução de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF, aumento de factores de crescimento hematopoiéticos como a Epo, IL-3 e GM-CSF e redução do STAT3 fosforilado (Pesu e Laurence, 2008). Em altas doses pode levar ao aparecimento de trombocitopenia.

Foram também efectuados estudos com **Erlotinib** que mostraram que este actua como um potente inibidor da JAK2V617F inibindo preferencialmente células progenitoras hematopoiéticas com esta mutação em doentes com PV, ou seja, apesar de também poder promover alguma actividade inibitória sobre a JAK2 normal e outros membros da família das tirosinas cinase JAK, acredita-se que pode inibir selectivamente a JAK2V617F (Li Z *et al.*, 2007). O **Desatinib** e o **Sunitinib** são dois inibidores de proteínas cinase multi-alvo aprovados pela FDA para tratamento do cancro, mas pouco se sabe acerca da sua eficácia no tratamento da PV (Pesu e Laurence, 2008).

Apesar de serem fármacos promissores no tratamento da PV, os inibidores JAK2, apresentam três preocupações maior: 1) Todos têm como alvo a JAK2V617F, mas também atingem a JAK2 normal, aumentando a preocupação da sua potencial toxicidade; 2) A mutação JAK2V617F existe em células progenitoras hematopoiéticas, o que significa que a terapêutica anti-JAK2 tem que ser eficiente contra estas células para ser curativa; 3) A utilidade de inibir uma proteína mutada, que pode não ser o evento patogénico encontrado (James C, 2008). Além do referido, e como a proteína JAK2 tem funções importantes na sinalização celular, indispensável na hematopoiese e especificamente eritropoiese, então existe a possibilidade da inibição da JAK2 poder causar citopenias dose-dependentes, principalmente anemia (Levine e Werning, 2006).

Pequenas moléculas inibidoras da sinalização JAK-STAT estão a ser desenvolvidas recentemente, oferecendo potencial para terapêutica molecularmente dirigida em doentes com PV, TE e MFI (Levine e Werning, 2006). No entanto, continua pouco claro que seja possível desenvolver inibidores PTK selectivos, sem toxicidade substancial, o que torna, por enquanto, a hipótese de terapêutica alvo ainda pouco clara, apesar de ser uma estratégia útil (Pesu e Laurence, 2008).

## **9. EVOLUÇÃO DA DOENÇA**

É comum a transformação das NMP umas nas outras: TE em PV ou MFI e de PV em MFI (Delhommeau F *et al.*, 2006). Doentes com TE portadores da mutação JAK2V617F podem, de facto ser indivíduos com «PV inaparente» em que, a expansão do volume plasmático pode mascarar o aumento absoluto na massa de eritrócitos (Schafer A, 2006). No

entanto, a evolução de determinada NMP para outras formas de doença ainda está pouco esclarecida.

O aumento de fibras de reticulina na MO pode ocorrer com o evoluir da doença quer na PV quer na TE e em muitos doentes desenvolve-se uma síndrome similar à MFP. A transformação em mielofibrose pós-policitémia, conhecida como fase de aceleração da PV, representa a evolução natural da doença (Mesa R, 2007), sendo caracterizada por diminuição progressiva da eritropoiese e granulopoiese. Esta evolução ocorre em 5% dos casos, 15 anos após o diagnóstico, diminuindo a sobrevida dos doentes (Vannucchi A *et al.*, 2009). Caracteriza-se por clínica semelhante à da MFP (anemia e outras citopenias, poiquilocitose em lágrima e outras alterações leuco-eritroblásticas no Sp, esplenomegalia e fibrose progressiva da medula) e pode estar também associada a osteosclerose (Swerdlow SH *et al.*, 2008). A sobrevivência dos doentes com PV que evoluíram para mielofibrose e metaplasia mielóide é mais baixa do que na MFP e é caracterizada por dominância da trissomia de 1q, uma anomalia rara na MFI (Schafer A, 2006). O risco de transformação em metaplasia mielóide pós-policitémia foi estimada em 10% após os 10 anos e 20% após os 25 anos (Cortes e Kantarjian, 2004).

No entanto, o risco de progressão para mielofibrose é significativamente menor nos doentes tratados com quimioterapia comparativamente com que apenas foram submetidos a flebotomia (Passamonti F *et al.*, 2000). Com muita frequência, as NMP terminam em falência medular devido a mielofibrose ou hematopoiese ineficaz culminando na crise e transformação blástica (Haferlach T, 2008).

A proliferação de células da MO responsáveis pelo aumento da fibrose, angiogénese e osteogénese na PV, é um processo mais reactivo do que clonal. Apesar do processo

patogénico permanecer desconhecido, envolve megacariócitos anómalos que sintetizam e libertam localmente citocinas fibrogénicas como: o factor de crescimento do endotélio vascular, o factor de crescimento fibroblástico e o factor de crescimento transformador  $\beta$  (Campbell P *et al.*, 2006; Schafer A, 2006). O aumento no número de células imaturas pode ser observada neste estágio (mielofibrose pós-policitemia), mas a descoberta de mais de 10% de blastos no sangue periférico ou na medula óssea, ou a presença de mielodisplasia significativa, não é frequente, sendo sinais típicos de transformação para uma fase acelerada e/ou síndrome mielodisplásica. Casos em que sejam encontrados 20% ou mais blastos são considerados LMA (Swerdlow SH *et al.*, 2008).

A transformação em leucemia, como processo evolutivo das NMP, pode ocorrer sem exposição a terapêutica citorrredutora, mas a incidência aumenta na sua presença (Campbell P *et al.*, 2006; Spivak e Silver, 2008) e, provavelmente, reflecte aquisição de lesões genéticas adicionais. Alguns factores de risco estão associados à transformação leucémica como a idade avançada, a contagem leucocitária elevada e à longa duração da doença (Vannucchi A *et al.*, 2009).

Muitos dos doentes JAK2V617F-positivos adquirem LMA JAK2V617F-negativa independentemente do tratamento previamente recebido, sugerindo uma LMA de novo ou uma origem clonal comum de NMP JAK2V617F e LMA (James C, 2008). No entanto, a LMA desenvolve-se numa pequena minoria de doentes com NMP (no estudo ECLAP, estimou-se que ocorreria em aproximadamente 1,3% dos casos de PV, numa média de 8,4 anos após o diagnóstico). A transformação para leucemia linfoblástica aguda é extremamente rara (Cortes e Kantarjian, 2004).

Dos doentes com PV com a mutação JAK2V617F, os que apresentam carga alélica mais elevada (maior de 50%) são os que exibem níveis mais elevados de hemoglobina e taxas mais altas de transformação fibrótica e maior propensão à progressão para mielofibrose pós-PV (Guglielmelli P *et al.*, 2008; James C, 2008).

Num estudo retrospectivo realizado em 65 doentes, dos quais 43 eram portadores de mielofibrose pós-policitémia e 22 de mielofibrose pós-trombocitémia verificou-se que o tempo médio decorrido desde o diagnóstico primário de PV e TE até o desenvolvimento de mielofibrose era de 112 meses para mielofibrose pós-PV e 137 para mielofibrose pós-TE. O *follow-up* médio desde o diagnóstico de mielofibrose foi de uma média de 39 meses. Destes doentes, 8 desenvolveram LMA, 7 dos quais morreram em média 26 meses após o diagnóstico de Leucemia. Dos doentes com mielofibrose pós-PV, 100% eram JAK2V617F positivos (Guglielmelli P *et al.*, 2008).

## **10. CONCLUSÕES**

A Policitemia Vera (PV) é uma doença clonal de etiologia desconhecida, na maior parte dos casos, que envolve a célula estaminal progenitora hematopoiética multipotencial. É uma neoplasia mieloproliferativa crónica (NMP) que se caracteriza pela expansão das três linhas celulares hematopoiéticas: eritróide, granulocítica e megacariocítica, com predomínio da primeira, de modo independente dos mecanismos normais de regulação da eritropoiese.

No entanto, a eritrocitose só por si, é insuficiente para o diagnóstico definitivo e a variabilidade fenotípica da PV é um factor que obriga à necessidade de mais critérios conjugados para se chegar a uma conclusão diagnóstica.

Além dos avanços no diagnóstico, a actual detecção de anomalias citogenéticas, nomeadamente alterações do gene JAK2 e em especial a mutação JAK2V617F, têm dado um contributo precioso na abordagem diagnóstica contribuído para melhorar a classificação e a terapêutica dos doentes com PV.

Deste modo, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na PV tem levado os investigadores à descoberta de novos fármacos dirigidos ao defeito molecular, permitindo novas abordagens terapêuticas mais eficazes e provavelmente de menor toxicidade.

Apesar das muitas descobertas, permanecem por responder questões como: Qual a razão da existência de pleiotrofismo fenotípico em doentes com NMP com o mesmo alelo da doença? Como é que uma única lesão genética pode originar três entidades clínicas tão distintas? Porque é que nem todos os doentes apresentam a mutação JAK2V617F? Que efeitos podem ser esperados da inibição do JAK2 (há inibição selectiva do JAK2V617F)? Pode a inibição da via JAK-STAT diminuir a mieloproliferação?

Possivelmente, a resposta a estas questões serão um ponto de chegada para a compreensão destas doenças e o ponto de partida para a descoberta de novas abordagens terapêuticas eficazes.

## 11. Referências Bibliográficas:

1. Agarwal N., Mojica-Henshaw M. et al. (2007) **Familial Polycythemia Caused by a novel mutation in beta globin gene: Essential role of P50 in evaluation of familial polycythemia.** International Journal of Medical Sciences. 4: 232-236.
2. Barbui T., Finazzi G. (2006) **Myeloproliferative Disease in Pregnancy and Other Management Issues.** American Society of Hematology. 246-252
3. Barbui T., Finazzi G. (2007) **How I treat patients with polycythemia vera.** Blood. 109: 5104-5111
4. Baxter E., Scott L. et al (2005) **Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders.** The Lancet. 365:1054-1061
5. Burkitt M. and Raafat A (2006) **Nitric oxide generation from hydroxyurea: significance and implications for leukemogenesis in management of myeloproliferative disorders** Blood 107: 2219-2222
6. Campbell P., Green A. et al. (2006) **The myeloproliferative disorders.** Review article of the New England journal of medicine. 355: 2452-2466
7. Cortes J., Kantarjian H. (2004) **Beyond Chronic Myelogenous Leukemia – Potential Role for Imatinib in Philadelphia-Negative Myeloproliferative Disorders.** Cancer. 100 (10):2064-2078
8. Dameshek W. (1951) **Editorial: Some speculations on the Myeloproliferative Syndromes** – Blood. 6: 372-375
9. Delhommeau F., Pisani D. et al (2006) **Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders.** Cellular and Molecular Life Sciences. 63:2939-2953.
10. Diehn F., Tefferi A. (2001) **Pruritus in polycythemia vera: prevalence, laboratory correlates and management.** British Journal of Haematology 115: 619-621
11. Finazzi G., Barbui T. (2007) **The treatment of polycythaemia vera: an update in the JAK2 era.** Intern Emerg Med. 2:13-18
12. Fourouclas N., Li J. et al (2008) **Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders.** Haematologica. 93(11): 1635-1644



13. Gaikwad A., Nussenzveig R. et al (2007). **In Vitro Expansion of Erythroid Progenitors from Polycythemia Vera Patients Leads to Decrease in JAK2V617F Allele.** Exp.Hematologica. 35(4): 587-595
14. Gaikwad A., Prechal J. (2007) **Study of Two Tyrosine Kinase Inhibitors on Growth and Signal Transduction in Polycythemia Vera.** Exp. Hematol. 35(11): 1647-1656
15. Girodon F., Schaeffer C. et al (2008) **Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy.** Haematologica. 93(11):1723-1727
16. Guglielmelli P., Barosi G., et al (2008) **JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis.** Haematologica.13721. Letters to the editor.
17. Haferlach T., Bacher U. et al (2008) **The diagnosis of BCR/ABL- negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers.** Ann Hematol 87:1-10
18. Hattori N, Fukuchi K, et al. (2008) **Megacaryopoiesis and platelet function in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with JAK2V617F mutation** – International Journal Hematology. 88: 181-188
19. Helmann A. (2008) **Myeloproliferative syndromes: diagnosis and therapeutic options** – Polskie archiwum medycyny wewnetrznej. 118: 756-759
20. Ishii T., Zhao Y. et al (2007) **Behavior of CD34<sup>+</sup> cells isolated from patients with polycythemia vera in NOD/SCID mice.** Experimental Hematology. 35: 1633-1640
21. Jabbour E., Kantarjian H. et al (2007) **PEG-IFN- $\alpha$ -2b Therapy in BCR-ABL-negative Myeloproliferative Disorders.** Cancer 110 (9):2012-2018
22. James C. (2008) **The JAK2V617F Mutation in Polycythemia Vera and Other Myeloproliferative Disorders: One Mutation for Three Diseases?** American Society of Hematology: 69-75

23. Kaushansky K. (2005) **On the Molecular Origins of the Chronic Myeloproliferative Disorders: It All Makes Sense.** American Society of Hematology. 533-537
24. Kaushansky K. (2006) **Hematopoietic Growth Factors, Signaling and the Chronic Myeloproliferative Disorders.** Cytokine Growth Factor Rev. 17(6): 423-430
25. Keersmaecker K., Cools J.(2006) **Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine Kinase tale.** Leukemia. 20: 200-205
26. Kiladjian J, Casadevall N, Vainchenker W, Fenaux P.(2007) **The first international meeting on V617F JAK2 mutation and its relevance in Philadelphia-negative myeloproliferative disorders** – Pathologie Biologie. 55: 85-87.
27. Kiladjian JJ., Cassinat B. et al (2008) **Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera.** Blood. 112:3065-3072
28. Kiladjian JJ., Chomienne C., Fenaux P. (2008) **Interferon- $\alpha$  therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms.** Leukemia. 22: 1990-1998
29. Kota J., Caceres N., Constantinescu SN. (2008) **Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms.** Leukemia 22: 1828-1840
30. Kralovics R. (2008) **Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms.** Leukemia 22: 1841-1848
31. Kralovics R. et al (2005) **A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders.** The New England Journal of Medicine. 352:1779-1790.
32. Kralovics R., Teo S. et al (2005) **Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlate with activation of signaling by the V617F mutation of JAK2.** Blood. 5:1889
33. Laibe S., Tadriz Z. et al (2009) **A myeloproliferative disorder may hide another one.** Leukemia Research. LR-3361
34. Landgren O., Goldin L. et al (2008) **Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24577 first-degree relatives of 11039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden.** Blood 112: 2199-2204

35. Landolfi R., Di Gennaro L. (2008) **Prevention of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia.** *Haematologica* 93(3): 331-335
36. Levine R, Gilliland D. (2008) **Myeloproliferative Disorders** – *Blood* . 112: 2190-2198.
37. Levine R., Werning G. (2006) **Role of JAK-STAT Signaling in the Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders.** *American Society of Hematology.* 233-239
38. Li S., Kralovics R. et al (2008) **Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2V617F mutations.** *Blood.* 111:3863-3866
39. Li Z., Xu M. et al (2007) **Erlotinib Effectively Inhibits JAK2<sup>v617f</sup> Activity and Polycythemia Vera Cell Growth.** *J. Biol Chem.* 282(6):3428-3432
40. Linardi C., Pracchia L., Buccheri V. (2008) **Diagnosis and treatment of polycythemia vera: Brazilian experience from a single institution.** *São Paulo Med. J.* 126(1): 52-57
41. Maran J., Prchal J. (2004) **Polycythemia and oxygen sensing.** *Pathologie Biologie* 52: 280-284.
42. McLornan D *et al.* (2006) **JAK2V617F: A Single Mutation in the Myeloproliferative Group of Disorders.** *Ulster Medical Journal* 75(2): 112-119
43. Mesa R. (2007) **Navigating the Evolving Paradigms in the Diagnosis and Treatment of Myeloproliferative Disorders.** *American Society of Hematology:* 355-362
44. Michiels JJ., Bernema Z. et al (2007) **Current diagnosis criteria for the chronic myeloproliferative disorders (MPD) essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV) and chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF).** *Pathologie Biologie* 55: 92-104
45. Michiels J., Berneman Z. et al (2006) **Platelet-mediated erythromelalgic, cerebral, ocular and coronary microvascular ischemic and thrombotic manifestations in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera: A distinct aspirin-responsive and Coumadin-resistant arterial thrombophilia.** *Platelets* 17(8):528-544
46. Moliterno A., Williams D. et al (2006) **Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2V617F and Mpl expression.** *Blood.* 108: 3913-3915

47. Passamonti F., Brussamolino E. et al (2000) **Efficacy of pipobroman in the treatment of polycythemia vera: long term results in 163 patients.** Haematologica 85: 1011-1018
48. Pesu M., Laurence A. (2008) **Therapeutic targeting of Janus kinases.** NIH public access Immunol Rev. 223: 132–142.
49. Pietra D., Li S. et al (2008) **Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders.** Blood 111: 1686-1689
50. Poullin P., Lefèvre P. (2008) **Therapeutic erythrocytapheresis: Technical aspects and clinical applications.** La revue de médecine interne. 29:290-296
51. Rickesten A., Palmqvist L., et al (2008). **Rapid decline of JAK2V617F levels during Hydroxyurea treatment in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia.** Haematologica. 93 (8): 1260-1261
52. Rozman C., Giralt M. et al. (1991) **Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders.** Cancer. 67: 2658-2663
53. Ruggeri M., Rodeghiero F. (2008) **Postsurgery outcomes in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: a retrospective survey.** Blood. 111: 666-671
54. Samuelsson J., Mutschler M. (2006) **Limited effects on JAK2 mutational status after pegylated interferon  $\alpha$  2b therapy in polycythemia vera and essential thrombocythemia.** Haematologica 91(9):1281-1282
55. Sarmiento Ribeiro, A. B., Resende de Oliveira, C.. Integração do Metabolismo – Biossinalização, parte VIII, cap 38. In Bioquímica, editado por Lidel, edições técnicas, coordenado por Halper M. J., 2007.
56. Schafer A. (2006) **Molecular Basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia –** Blood. 107: 4214-4222
57. Scott I., Poynton C. (2008) **Polycythaemia rubra vera and myelofibrosis with spinal cord compression.** Journal of Clinical Pathology. 61: 681-683
58. Sillero J., Cañete F.(2007) **Los desordenes mieloproliferativos médio siglo después.**

59. Silver RT (2003) **Imatinib mesylate (Gleevec™) reduces phlebotomy requirements in polycythemia vera.** *Leukemia*. 17: 1186-1187
60. Skoda R. (2007) **The Genetic Basis of Myeloproliferative Disorders.** American Society of Hematology (Ham- Wasserman Lecture).
61. Spivak J. (2008) **Polycythemia Vera and Other Myeloproliferative disorders.** <sup>17th</sup> Harrison Internal Medicine. Oncology and Hematology 103: 671-677
62. Spivak J., Barosi G., Barbui T. et al. (2003) **Chronic Myeloproliferative Disorders.** American Society of Hematology 2003; 200-224.
63. Spivak J., Silver R. (2008) **The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal.** *Blood*. 112: 231-239.
64. Squizzato A, Romualdi E, Middeldorp S (2008) **Antiplatelet drugs for polycythemia vera and essential thrombocythaemia.** Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 2. Art. Nº: CD006503
65. Steensma D, Tefferi A. (2003) **Cancer Medicine.** Capítulos 45, 56, 125, 126, 137, 150
66. Steffano V., Za T. et al (2008) **Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential Thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect on treatments.** *Haematologica* 93(3): 372- 380
67. Steurer M., Gasti G. et al (2004) **Anagrelide for Thrombocytosis in Myeloproliferative Disorders.** American Cancer Society. 101(10):2239-2246
68. Stuart B, LT, MC, USNR, Viera A. (2004) **Polycythemia Vera – American Family Physician.** 69: 2139-2144.
69. Swerdlow SH et al (2008) **WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** International Agency for Research on Cancer 4<sup>th</sup> Edition.
70. Tefferi A. (2003) **Polycythemia Vera: A Comprehensive Review and Clinical Recommendations.** *Mayo Clinic Proceedings*. 78: 174-194
71. Tefferi A. (2006) **Classification, Diagnosis and Management of Myeloproliferative Disorders in the JAK2V617F Era.** American Society of Hematology. 240-245

72. Tefferi A., Gililand DG. (2007) **Oncogenes in Myeloproliferative Disorders**. Cell Cycle. 6: 5,550-566.
73. Teofili L., Giona F., et al (2007) **Markers of Myeloproliferative Diseases in Childhood Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia**. Journal of Clinical Oncology. 25: 1048-1053
74. Tutaeva V., Misurin A., et al (2007) **Application of PRV-1 mRNA expression level and JAK2V617F mutation for the differentiating between polycythemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea**. Hematology 12(6): 473-479
75. Vannucchi A., Guglielmelli P., Tefferi A. (2009) **Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms**. Cancer Journal for Clinicians. American Cancer Society.
76. Williams D. et al (2007) **Phenotypic variations and new mutations in JAK2V617F – negative polycythemia vera, erythrocytosis and idiopathic myelofibrosis**. Hematologica. 35(11): 1641-1646
77. Zhao R., Xing S. et al (2005) **Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera**. J Biol Chem. NIH Public Access. 280(24):22788-2279