

GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO V617F DE *JAK2* POR PCR QUANTITATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Leticia Cristina de Almeida Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM); Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka (pesquisadora); Quirino Alves de Lima Neto (coorientador); Ana Maria Sell (orientadora); e-mail: anamsell@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas – Imunologia/Imunogenética.

Palavras-chave: polimorfismo de nucleotídeo único; Janus quinases; reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Resumo:

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são doenças clonais que atingem células-tronco da linhagem hematopoiéticas. Dentre as neoplasias que são BCR-ABL negativa, estão a policitemia vera, trombocitemia essencial e a mielofibrose idiopática, que possuem características semelhantes. Além disso, em todas elas a grande maioria dos pacientes possuem uma mutação adquirida específica no gene *JAK2*. O objetivo desse estudo foi realizar a genotipagem da mutação *JAK2 V617F* (rs77375493) em pacientes portadores de NMPs e indivíduos saudáveis utilizando uma técnica sensível, a de qPCR, para a detecção desta mutação. Houve uma diferença significativa ao se comparar os alelos e genótipos da mutação estudada entre pacientes e controles, o que nos demonstra que a técnica de qPCR é bastante adequada para a detecção dessa mutação e genotipagem dos indivíduos.

Introdução

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são doenças clonais que atingem células-tronco da linhagem hematopoiéticas. Entre as NMPs BCR-ABL negativas, as mais comuns são a policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose idiopática (MF). Recentemente, observou-se que entre as três NMPs, havia características clínicas e patológicas semelhantes. Notou-se que a maioria dos pacientes com PV (>80%) e cerca da metade dos pacientes com TE e MF apresentavam uma mutação adquirida específica no gene *JAK2* (Jones, 2005).

O gene *JAK2* está presente no cromossomo 9 e codifica um receptor celular, que faz parte da via de sinalização JAK/STAT, fundamental para a proliferação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos. O Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) no gene *JAK2* (rs77375493), se caracteriza por ser uma mutação pontual no códon 617, presente no éxon 14, que resulta na troca de guanina por timina (G>T), o que leva a uma substituição de uma valina por fenilalanina na proteína codificada (V617F) (Veneri, 2009). Esta alteração é somática, ou seja, ela é adquirida durante a vida do indivíduo, podendo ser detectada em células da linhagem eritroide e mieloide (Levine, 2008).

A mutação *V617F* ocorre dentro do domínio pseudo-quinase (JH2) da proteína, sendo capaz de modular a atividade da JAK2, aumentando a atividade catalítica dessa proteína (Veneri, 2009). Citocinas e fatores de crescimento utilizam as proteínas da família JAK quinase para a propagação de sinais intracelulares, o que resulta no efeito final da ativação do receptor pelo seu respectivo fator de crescimento ou citocina, que é a ativação de fatores de transcrição e aumento da expressão gênica (Levine, 2008).

Devido a característica somática da mutação, a detecção da mutação em pacientes com uma quantidade pequena de células contendo a mutação, ou seja, uma baixa carga alélica, ainda é um desafio (Ohyashiki, 2009). Isso leva a uma variação nas frequências da mutação dependendo da sensibilidade da técnica empregada.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi realizar a genotipagem da mutação *JAK2 V617F* (rs77375493) em pacientes portadores de NMPs e indivíduos saudáveis, utilizando uma técnica sensível para a detecção desta mutação, levando em consideração a baixa carga alélica apresentada por alguns pacientes.

Materiais e métodos

O trabalho foi executado seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Parecer COPEP nº 318.552).

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Um total de 157 indivíduos foram selecionados para participar deste estudo, sendo pacientes com NMPs (N=100) e controles sem NMPs (N=57). Após a coleta de sangue, realizou-se a extração de DNA usando coluna de sílica, por Biopur Kit Extração Mini Spin Plus (Mobius Life Science, Pinhais, PR, BR), seguindo as recomendações do fabricante.

Para verificar a qualidade do DNA foi realizado uma amplificação utilizando *primers* para o gene do hormônio do crescimento (*hGH*). O volume final da reação foi de 10,0 µL contendo os seguintes reagentes e suas concentrações finais: tampão 1X, 0,2 mM cada dNTP, 0,1 mM de *primers* hGH, 1,5 mM MgCl₂ e 0,5 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Todas as reações continham 50 ng de DNA genômico. As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições de ciclagem: 95 °C – 10 min, seguido de 30 ciclos à 95 °C – 30s, 62 °C – 30s e 72 °C – 30s, e por último, uma extensão final de 72 °C - 10 min. A visualização das bandas se deu com a corrida eletroforética em gel de agarose 2% a 150 V – 300 mA – 150 W por 10 min.

Após isso, a genotipagem para a mutação *V617F* foi realizada por qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). A cada amostra foi adicionado os seguintes reagentes: a) os *primers* específicos para amplificação de um fragmento do gene *JAK2*, contendo o SNP a ser genotipado; b) um par de sondas Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), cada uma contendo um fluoróforo diferente, e específica para um determinado alelo do SNP rs77375493; c) uma solução *Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), contendo a DNA polimerase, o tampão da reação, o MgCl₂ e os dNTPs. A leitura da emissão de fluorescência se deu concomitantemente à amplificação das amostras pelo

equipamento ABI Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados pelo do programa StepOne versão 2.3.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas OpenEpi e SNPStats para cálculos qui-quadrado e equilíbrio de Hardy-Weinberg. Considerou-se o valor de $P \leq 0,05$ com significância estatística.

Resultados e Discussão

Esse estudo contou com 157 indivíduos, dos quais 100 pertenciam ao grupo de pacientes e 57 ao grupo de controles. Entre os indivíduos do grupo de pacientes, 46 eram mulheres e 48 homens; já no grupo de controles, 18 eram mulheres e 29 homens. Os participantes são triados em hospitais, nos quais as informações são obtidas através de prontuários, e muitos deles não possuem dados completos, impossibilitando conhecer o sexo de todos.

A análise da distribuição dos genótipos demonstrou que a população controle encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P=1,0$). Diferente do grupo dos pacientes. Isso acontece, pois, a mutação é adquirida e não herdada (Levine, 2008), dessa forma, a análise de como ela ocorrerá em comparação à geração passada não pode ser definida.

Entre pacientes as frequências dos genótipos G/G, G/T e T/T foram de 65%, 21% e 14%, respectivamente; para os controles 100% dos indivíduos possuíam genótipo G/G, conforme o esperado. Ao analisar a frequência alélica, determinou-se que 75,5% dos pacientes possuem o alelo G e 24,5% o alelo T, além disso, entre os controles, 100% deles possuem o alelo G. Os dados estão contidos na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das frequências dos alelos e genótipos de *JAK2* e comparação entre os grupos de pacientes com neoplasias mieloproliferativas e controles sem a doença.

		Pacientes N=100 n (%)	Controles N=57 n (%)	<i>P-value</i>
Alelos	G	151 (75,5%)	57 (100%)	$P < 0,0001$
	T	49 (24,5%)	0 (0%)	
Genótipos	G/G	65 (65%)	57 (100%)	$P < 0,0001$
	G/T	21 (21%)	0 (0%)	
	T/T	14 (14%)	0 (0%)	

A presença de apenas um alelo mutado T, é o suficiente para os indivíduos serem tidos como portador da mutação (Kralovics, 2005). Levando isso em consideração, os participantes do estudo foram classificados como positivo ou negativo para *JAK2*. No grupo dos pacientes, 35% foi classificado como positivo e 65% como negativo. Já com os controles, todos foram classificados como negativo, já que não possuem a mutação.

Houve uma diferença na distribuição dos alelos quando comparamos pacientes e controles ($P \leq 0,05$), sendo o alelo G o mais frequente para ambos. De forma semelhante, usando o modelo dominante, observou-se diferença estatística na distribuição dos genótipos quando comparamos pacientes e controles, no qual o alelo G/G foi o mais comum ($P < 0,001$). Observando a frequência do alelo mutado

com a classificação de positivo e negativo entre os pacientes e controles, o alelo T parece ser fator de predisposição a doença, porém mais estudos são necessários.

Conclusões

Os resultados obtidos através das genotipagens mostraram que entre os pacientes com neoplasias mieloproliferativas, alguns deles apresentaram a mutação no gene de *JAK2*. Além disso a frequência do alelo selvagem “G”, foi maior nos participantes analisados, sendo o genótipo G/G o mais frequente no SNP rs77375493 (V617F) no gene *JAK2*. A técnica mostrou-se sensível à realização da genotipagem.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária e Laboratório de Imunogenética da UEM.

Referências

Jones A.V., Kreil S., Zoi K., Waghorn K., Curtis C. Zhang L. et al. Widespread occurrence of the *JAK2* V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. **Blood**, Washington, v.106, p.2162-2168, 2005.

Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.S., Tiedt R., Passweg J. et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.352, p.1779-1790, 2005.

Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. **Blood**, Washington, v.112, n.6 p.2190-2198, 2008.

Ohyashiki JH, Hisatomi H, Shimizu S, Sugaya M, Ohyashiki K. Detection of low allele burden of *JAK2* exon 12 mutations using TA-cloning in patients with erythrocytosis. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, Oxônia, v.39, n.8, p.509-513, 2009.

Veneri D, Capuzzo E., Matteis G., Franchini M., Baritono E., Benati M., Solero P., Ambrosetti A., Quresmini G., Pizzolo G. Comparison of *JAK2* V617F mutation assessment employing different molecular diagnostic techniques. **Blood Transfus**, Verona, v. 7, n.3, p.204-209, 2009.