**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRAO PRETO**

PEDRO HENRIQUE PADILHA

**Variantes do gene *THPO* em pacientes com anemia aplástica
adquirida**

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2017**

PEDRO HENRIQUE PADILHA

Variantes do gene *THPO* em pacientes com anemia aplástica adquirida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular, área de concentração Diferenciação Celular Normal ou Neoplásica, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues

“ Versão Corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Padilha, Pedro Henrique

Variantes do gene *THPO* em pacientes com anemia aplástica adquirida / Pedro Henrique Padilha. Ribeirão Preto, 2017.

49 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Orientador: Rodrigues, Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma.

1. Anemia Aplástica (AA). 2. Falência medular (FM). 3. Trombopoetina. *THPO*. 4. Variantes genéticas.

Nome: Pedro Henrique Padilha

Título: Variantes do gene *THPO* em pacientes com anemia aplástica adquirida

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências junto ao Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular, área de concentração Diferenciação Celular Normal e Neoplásica, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues pela oportunidade, confiança e ensinamentos durante o curso de desenvolvimento deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Roberto Passeto Falcão, Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego, Prof^a Dr^a Belinda Simões Pinto e Prof^a Dr^a Fabiola Traina pela disponibilização da estrutura dos laboratórios utilizados na execução deste projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelas oportunidades oferecidas para a minha formação profissional.

Ao Departamento de Clínica Médica e Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela receptividade e todas as oportunidades de aprendizado.

Ao Departamento de Hematologia da Universidade Federal do Paraná pela disponibilidade e gentileza no acesso às informações concernentes aos prontuários dos pacientes que integraram a tese.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini, Prof. Dr. Samir Kannan Nabhan, Dr^a Larissa Alessandra Medeiros, Dr. Marco Russo pela imensa gentileza e presteza na obtenção das informações sobre os pacientes da amostra

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva e a funcionária Adriana Aparecida Marques pela colaboração nos experimentos de sequenciamento.

À equipe do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelas orientações e treinamento para a realização da técnica utilizada na investigação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luis Barbosa pelo apoio na orientação Estatística.

Ao Grupo do Laboratório de Hematologia: Fernanda Gutierrez, Raquel, Flavia Donaires, Florencia, Natalia, Barbara, Ritinha, Leonardo, Doutor Diego Villa Clé, Ana Paula, Silvia, Virginia, Larissa, Luciana, Aglair, Priscila, Ana Silvia e Adriana pela ajuda técnica e pela força nos momentos difíceis.

À Secretaria de Pós-Graduação, pelas informações, orientações e disponibilidade no decorrer das várias etapas do curso de doutorado.

RESUMO

Padilha PH. **Variantes do gene *THPO* em pacientes com anemia aplástica adquirida.** 2017. 49 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: A anemia aplástica (AA) adquirida é uma doença grave, caracterizada por pancitopenia e medula óssea hipocelular sem que haja associação com aumento de reticulina ou infiltração anormal na medula. Embora o mecanismo fisiopatológico não esteja totalmente elucidado, atribui-se a uma resposta imunomediada dos linfócitos T no ambiente medular. A trombopoetina (codificada pelo gene *THPO*) é um hormônio glicoproteico produzido pelo fígado e responsável pelo estímulo de crescimento de megacariócitos, desenvolvimento plaquetário e de demais linhagens e, quando disfuncional, contribui para o desenvolvimento da AA adquirida.

Objetivos: Investigar a presença de variantes genéticas no *THPO* em amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com AA adquirida (grupo caso) e de indivíduos saudáveis (grupo controle) e verificar a presença de alterações no número de plaquetas durante o seguimento dos pacientes com AA adquirida.

Métodos: O gene *THPO* foi sequenciado em amostras de DNA de medula óssea de 92 pacientes com AA adquirida e no DNA de sangue periférico de 92 controles, cujas amostras haviam sido previamente armazenado no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger. Realizou-se também a associação entre a presença (ou ausência) de variantes em *THPO* e o número de plaquetas em 83 pacientes utilizando o teste ANOVA. Para outras análises estatísticas, foram utilizados os testes t e qui-quadrado com nível de significância de 5%. **Resultados:** Foram encontrados três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos pacientes com AA adquirida (rs956732, rs6141 e rs3804618). Os mesmos três SNPs foram observados nos indivíduos do grupo controle ($p>0,05$). Não houve associação entre o número de plaquetas e a presença de SNPs nos pacientes ($p>0,05$). **Conclusões:** Três SNPs foram encontrados em frequências alélicas semelhantes tanto no grupo de pacientes quanto nos controles, sugerindo que a trombopoetina não apresenta alterações genéticas que possam ser associadas à fisiopatologia da AA adquirida nessa coorte.

Palavras-chaves: Anemia Aplástica (AA). Falência medular (FM). Trombopoetina. *THPO*. Variantes genéticas.

ABSTRACT

Padilha PH. ***THPO* gene variants in patients with acquired aplastic anemia.** 2017. 49p. Thesis (Doctoral) - Ribeirão Preto School of Medicine at the University of São Paulo, 2017.

Introduction: Acquired aplastic anemia (AA) is a severe illness, characterized by pancytopenia and hypocellular bone marrow without increased reticulin or abnormal infiltration of the bone marrow. Although the physiopathological mechanism has not been completely understood, an immune-mediated T-lymphocyte response has been attributed to the bone marrow environment. Thrombopoietin (encoded by *THPO*), a glycoprotein hormone produced by the liver and responsible for stimulating the growth of megakaryocytes, development of platelets and other lineages that when dysfunctional, contributes to the progress of acquired AA. **Objectives:** To screen the *THPO* gene for genetic variants in bone marrow of acquired AA patients and in the peripheral blood of controls, and to verify the correlation between the *THPO* status and platelet counts in the patients during the treatment. **Method:** Sanger sequencing of the *THPO* gene was carried out in 92 acquired AA patients (case group) and 92 controls, in DNA samples previously stored in the Hematology Laboratory of the Ribeirão Preto School of Medicine at the University of São Paulo. The association between the *THPO* status and the platelet counts was performed in 83 patients through the ANOVA test. The Chi-squared test and t-test were also applied for statistical analysis with a 5% significance level. **Results:** Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in the AA patients (rs956732, rs6141, and rs3804618), as well as in the healthy subjects ($p>0,05$). No association was verified between the platelet counts and the presence of SNPs in the AA patients ($p>0,05$). **Conclusion:** Three SNPs were found in both groups, suggesting that thrombopoietin does not harbor genetic variants that could be etiological for the acquired AA in our cohort.

Key words: Aplastic Anemia. Bone marrow failure. Thrombopoietin. *THPO*. Genetic variants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação linear da estrutura do gene <i>THPO</i> com a localização dos SNPs encontrados nos pacientes e indivíduos saudáveis.....	29
Figura 2	Fragmento do cromatograma representando a região do éxon 2 em que foi observado o SNP rs956732 (assinalado no retângulo vermelho).....	30
Figura 3	Fragmento do cromatograma representando a região do éxon 6 em que foi observado o SNP rs6141 (assinalado no retângulo vermelho).....	30
Figura 4	Fragmento do cromatograma representando a região do éxon 6 em que foi observado o SNP rs3804618 (assinalado no retângulo vermelho).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da anemia aplástica.....	13
Tabela 2	Critérios diagnósticos das anemias aplásticas congênitas	14
Tabela 3	Sequência dos <i>primers</i> específicos e condições para amplificação dos éxons do gene <i>THPO</i>	25
Tabela 4	Características clínicas dos pacientes (n=83).....	28
Tabela 5	SNPs e sua frequência alélica nas amostras dos pacientes com AA adquirida (grupo caso) e indivíduos saudáveis (grupo controle).....	32
Tabela 6	SNPs e o número de plaquetas dos pacientes com AA adquirida.....	33

LISTA DE SIGLAS

AA – Anemia Aplástica

ATG - *Anti-thymocyte globulin*

CALR – *Calreticulin*

CAMT - *Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia*

CSA – *Ciclosporin*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

EBMT – *European Blood and Marrow Transplantation*

FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HCRP – Hospital das Clinicas de Ribeirão Preto

HLA - *Human Leukocyte Antigen*

HPN – *Hemoglobinuria paroxística Noturna*

JAK -2 - Janus kinase 2

NIH – *National Institutes of Health*

NK – *Natural killers*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TCR - *T-cell receptor*

THPO – *Thrombopoietin*

UFPR – Universidade Federal do Paraná

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Anemia Aplastica.....	12
1.2	Mecanismos fisiopatológicos da anemia aplástica adquirida.....	15
	1.2.1. Linfócitos e Citocinas.....	16
	1.2.2. Telômeros	17
1.3	Trombopoetina.....	17
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos.....	21
3.	MATERIAL E MÉTODO.....	22
3.1	Amostras.....	23
3.2	Revisão de Prontuários	23
3.3	Sequenciamento de Sanger.....	24
3.4	Análise Estatística.....	26
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Características da Amostra de Pacientes.....	28
4.2	SNPs no gene <i>THPO</i>	28
4.3	SNPs e evolução quantitativa de plaquetas.....	32
5	DISCUSSÃO.....	34
6	CONCLUSÃO.....	38
	REFERENCIAS.....	40
	ANEXOS.....	45
	Anexo A.....	46
	Anexo B.....	47
	Anexo C.....	48
	Anexo D.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anemia Aplástica

A anemia aplástica (AA) é uma doença hematológica caracterizada pela redução na contagem de duas ou mais linhagens celulares no sangue periférico (pancitopenia) e hipocelularidade da medula óssea (BACIGALUPO et al, 1988; CAMITTA et al, 1976). Essas características são decorrentes da perda progressiva das células-tronco e progenitoras hematopoéticas, levando à falência da medula óssea. A doença é rara, atingindo aproximadamente 1 a 2 pacientes por milhão de habitantes nos países ocidentais, tendo sua incidência aumentada em duas a três vezes nos países do leste asiático. A maioria dos casos se desenvolve em pacientes com idade entre 10 e 25 anos, havendo outro pico importante de incidência após os 60 anos (MIANO; DUFOUR, 2015).

A primeira descrição da doença foi realizada por Ehrlich no final do século XIX, associando o desenvolvimento da doença à história pregressa e hábitos do paciente (YOUNG; CALADO SCHEINBERG, 2006). As primeiras associações com o desenvolvimento da AA relacionava-se à utilização de produtos químicos e fármacos como cloranfenicol e dipirona (YOUNG; CALADO SCHEINBERG, 2006).

O diagnóstico utilizado considera a presença de pancitopenia associada à presença de medula óssea hipocelular, na ausência de sinais de displasia ou fibrose medular. O envolvimento de ao menos duas linhagens hematopoiéticas acometidas é mandatório. Valores necessários encontram-se com níveis de hemoglobina $<10\text{g/dL}$ e/ou neutrófilos $<1,5 \times 10^9$ e/ou plaquetas $<50 \times 10^9$ (BACIGALUPO et al, 1988; CAMITTA et al, 1976).

A patologia pode ser classificada segundo a sua gravidade em moderada, grave ou muito grave, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação da anemia aplástica.

Anemia aplástica moderada	Medula óssea hipocelular e citopenias periféricas sem satisfazer os critérios para anemia aplástica muito grave com pelo menos 2 dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobina $<10\text{g/dL}$ • Plaquetas $<50 \times 10^9/\text{L}$ • Neutrófilos $<1,5 \times 10^9/\text{L}$
Anemia aplástica grave	Celularidade de medula óssea $<25\%$ e pelo menos 2 dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos $<0,5 \times 10^9/\text{L}$ • Plaquetas $<20 \times 10^9/\text{L}$ • Contagem de reticulócitos $<1\%$
Anemia aplástica muito grave	Celularidade de medula óssea $<25\%$ e neutrófilos $<0,2 \times 10^9/\text{L}$

Fonte: adaptado de BACIGALUPO et al, 1988; CAMITTA et al, 1976.

Pacientes que preencham os critérios descritos podem ser afetados por diversas condições que precisam ser excluídas, como síndrome mielodisplásica e leucemias agudas. Há outra forma de diferenciação com base na origem da AA, podendo ser dividida em congênita e adquirida (MIANO; DUFOUR, 2015).

As doenças que apresentam os mesmos critérios e são consideradas congêntas são decorrentes de mutações genéticas, e incluem a anemia de Fanconi, disceratose congênita, síndrome de Shwachman-Diamond, anemia de Blackfan-Diamond, trombocitemia congênita amegacariocítica e síndrome de Pearson (MIANO; DUFOUR, 2015). A Tabela 2 apresenta as alterações genéticas e critérios diagnósticos das enfermidades supracitadas:

Tabela 2 – Critérios diagnósticos das anemias aplásticas congênitas.

Anemia aplástica congênita	Critérios diagnósticos
Anemia de Fanconi	DEB teste ou teste de quebra cromossômica induzida por mitomicina
Telomeropatias <ul style="list-style-type: none"> • Disceratose Congenita • Fibrose Pulmonar • Doenças Hepáticas 	<ul style="list-style-type: none"> • Encurtamento telomérico • Mutação em <i>DKC1</i>, <i>TERC</i>, <i>TERT</i>, <i>TINF2</i>, <i>NOP10</i> ou <i>NPH2</i>
Síndrome de Shwachman-Diamond	Insuficiência pancreática
Anemia de Blackfan-Diamond	Alteração no gene <i>SBDS</i>
Trombocitemia congênita amegacariocítica	Alteração em <i>c-MPL</i>
Síndrome de Pearson	Análise de DNA mitocondrial

Fonte: adaptado de MIANO; DUFOUR, 2015

Já a AA adquirida é caracterizada por uma resposta imunomediada dos linfócitos T na medula óssea. O principal diagnóstico diferencial da AA adquirida é feito após a exclusão da síndrome mielodisplásica hipoplástica, que apresenta aberrações citogenéticas como trissomia do 8, trissomia do 6 e deleção do 13q. Além disso, há associação frequente entre hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e AA, sendo que clones de HPN são observados em 40 a 50% dos pacientes com AA (SCHEINBERG; YOUNG, 2012).

Os sintomas demonstrados pelos pacientes com AA são variados e inespecíficos. Parte dos pacientes apresenta-se com sangramentos ou cansaço devido à anemia e raros casos apresentam-se com infecção mesmo sendo neutropênicos (SCHEINBERG et al., 2010). Não são infrequentes as descobertas de pancitopenia em exames de rotina que levam ao diagnóstico de AA, bem como história prévia de citopenia de uma única linhagem, principalmente trombocitopenia (SCHEINBERG et al., 2010).

O tratamento da patologia vem sendo melhorado ao longo dos anos. Preferencialmente, em pacientes que possuem irmãos compatíveis, o tratamento consiste na realização de transplante de medula óssea alogênico (MIANO; DUFOUR, 2015). Este é realizado em enfermos com até 50 anos de idade, podendo ser estendido até os 60 anos (BHATNAGAR; WYNN; VELANGI, 2014). Há enfermos que possuem restrição ao transplante ou não possuem doador, sendo possível utilizar imunossupressores como tratamento.

As principais drogas utilizadas são a globulina antitimócito (ATG) e a ciclosporina (CSA). A combinação das drogas apresenta melhor resposta do que a utilização das mesmas separadamente (LOCASCIULLI et al., 2007). A ATG pode ser tanto de origem equina quanto cunicular. Na Europa, a partir de 2007, a ATG equina deixou de ser produzida, fato fundamental para a retomada de dois estudos feitos em grande escala pelos *National Institutes of Health* (NIH) e *The European Society for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT). Esses estudos demonstraram que pacientes que utilizam a ATG equina apresentam melhor sobrevida global (MIANO; DUFOUR, 2015).

A CSA deve ser iniciada no primeiro dia após transplante, com níveis menores que 200 ng/ μ L, sendo que a duração da administração é um fator crucial para a resposta. Alguns estudos relacionam, sobretudo em crianças, a retirada lenta com menor recaída da doença, enquanto estudos em adultos não fazem tal correlação (MIANO; DUFOUR, 2015).

Outra molécula que pode ser utilizada no tratamento da AA é o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), que reduz tanto o número de dias de internação quanto a taxa de infecção (TICHELLI et al., 2011). No entanto, não há evidências de que a administração de G-CSF aumente a sobrevida (MIANO; DUFOUR, 2015).

Apesar dos avanços já realizados no tratamento da AA, um maior entendimento da etiologia e dos mecanismos genéticos nela implicados ainda é necessário, o que pode contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes.

1.2 Mecanismos Fisiopatológicos da Anemia Aplástica adquirida

Segundo Young, Calado e Scheinberg (2006), a fisiopatologia da AA envolve diversos aspectos. Um grande número de dados laboratoriais e clínicos sugerem que imunossupressão da hematopoese é parte central da fisiopatologia. Entretanto, alterações intrínsecas em células-tronco hematopoéticas e mesenquimais contribuem para o desenvolvimento de falência medular (ZENG; KATSANIS, 2015).

Polimorfismos no complexo principal de histocompatibilidade (HLA)

podem estar associados à gênese da AA (ZENG; KATSANIS, 2015). Alguns alelos do HLA parecem apresentar função importante na resposta à terapia imunossupressora (NAKAO et al., 1997; SONG et al., 2010). Além disso, o complexo HLA pode eventualmente ativar clones de linfócitos T autorreativos sendo, portanto, responsável pela insuficiência da autorregulação destes clones e supressão da autoimunidade (ZANELI; BREEDVELD; DE VRIES, 2000).

1.2.1 Linfócitos e Citocinas

Característica importante da fisiopatologia da AA é o ataque de linfócitos T sobretudo as células-tronco hematopoéticas (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006). O início do estímulo se dá com a apresentação de antígenos as células T, tanto CD4+ quanto CD8+, causando uma expansão anormal de linfócitos constituindo uma característica definitiva da patologia (KORDASTI et al., 2012; ZENG et al., 2001).

Estes antígenos, são apresentados ha diversos receptores nestes linfócitos. Dentre eles, a detecção dominante de clones com receptores de células T (TCR) V-beta CDR3 alterados em pacientes com AA sugere uma expansão clonal destes linfócitos. Uma correlação entre a frequência destes linfócitos e a resposta a terapias imunossupressoras revela que estes podem ser utilizados como marcadores da doença e preditores da resposta ao tratamento (KOCHENDERFER et al., 2002; WLODARSKI, et al., 2006). A expansão clonal destes linfócitos é concebida através da produção de IL-2 (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006).

Os dados disponíveis até o presente sugerem que a expansão dos linfócitos Th1, Th2 e Th17 contribuem para a patogênese da AA, sobretudo no seu espectro grave. A sequência de eventos que leva à falência hematopoética ainda não é clara, mas sugere que a expansão de células Th1 provavelmente moduladas por antígenos ligados as células Th17 resulta em disfunção de células T reguladoras agravando a resposta imune (DE LATOUR et al., 2010; KORDASTI et al., 2012)

Com o aumento do número de linfócitos há um aumento significativo da produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sendo capazes de danificar células CD34+ e inibir a formação de colônias hematopoéticas (ZENG et al., 2001). Essas citocinas são as principais responsáveis pela redução da

formação de progenitores hematopoéticos *in vitro* através da indução de apoptose das células CD34+ pelas vias Fas-Lig e de TNF- α (ZENG; KATSANIS, 2015).

Outros mecanismos associados ao aumento da produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que levam a alteração dos progenitores hematopoéticos são o aumento de toxicidade a outras celular através do aumento da produção de oxido nítrico, a redução da síntese proteica e a redução do ciclo celular (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006).

1.2.2. Telômeros

Telômeros são estruturas compostas por milhares de sequências repetitivas de bases 5'-TTAGGG-3' ligadas a complexos proteicos específicos (CALADO; YOUNG, 2009). Essas estruturas estão localizadas nas extremidades dos cromossomos lineares e são responsáveis pela estabilidade genômica (MELICHER; BUZAS; FALUS, 2015), uma vez que servem para diferenciar essas extremidades de quebras de fita dupla do DNA. Além disso, os telômeros contribuem para a integridade dos cromossomos, pois evitam a perda de material genético durante o processo de replicação (MELICHER; BUZAS; FALUS, 2015).

O encurtamento telomérico excessivo foi associado a doenças humanas quando mutações no gene *DKC1* foram detectadas em uma forma rara de falência medular, a disceratose congênita (MITCHELL; WOOD; COLLINS, 1999). O encurtamento telomérico foi observado em células hematopoéticas de pacientes com AA, tanto hereditária quanto adquirida (CALADO; YOUNG, 2009).

Disfunções hematopoéticas causadas por defeitos na estrutura telomérica podem ter um espectro clínico abrangente. O fenótipo decorrente de mutações em genes da biologia dos telômeros pode se manifestar ao nascimento ou apenas na vida adulta, com penetrância variável, podendo gerar desde anormalidades sutis até alterações graves como pancitopenia (CALADO; YOUNG, 2009).

1.3. Trombopoetina

A trombopoetina vem sendo estudada como possível causa de falência medular. A trombopoetina, codificada pelo gene *THPO*, hormônio produzido pelo

fígado, é um regulador primário da expansão e diferenciação de megacariócitos, agindo na manutenção das células-tronco hematopoéticas, funcionando como uma citocina pan-hematopoética (HITCHCOCK; KAUSHANSKY, 2014).

O hormônio foi isolado por três grupos de pesquisadores quase simultaneamente, em 1994. Sua estrutura consiste em 353 aminoácidos com dois domínios (HITCHCOCK; KAUSHANSKY, 2014). O primeiro consiste em uma região homóloga a eritropoietina contendo um feixe de quatro hélices que se liga ao receptor *c-MPL* (BARTLEY et al., 1994; FEESE et al., 2004). O segundo domínio consiste em uma região carboxil-terminal, que não possui correspondência com nenhuma outra proteína. Tal domínio é responsável por duas funções: prolongar o tempo de circulação de meia vida do hormônio (HARKER et al., 1996), e servir como uma chaperona intermolecular que ajuda no dobramento adequado do polipeptídeo ao tornar-se um hormônio maduro (HITCHCOCK; KAUSHANSKY, 2014).

A interação entre a trombopoietina e o *c-MPL* ocorre na primeira e na quarta α -hélices da molécula, conectando a primeira e a segunda hélices (PEARCE Jr et al., 1997).

Mutações no *THPO*, no *c-MPL* e em outras estruturas relacionadas à via da trombopoietina são associadas a um grande espectro de alterações clínicas que variam desde alterações no número de plaquetas a alterações nas três linhagens hematopoéticas, como ocorre na AA e na mielofibrose (DASOUKI; SAADI; AHMED, 2015).

Mutações tanto em heterozigose quanto em homozigose no gene *c-MPL* tem sido associadas à trombocitemia congênita amegacariocítica (CAMT), com poucos casos de trombocitopenia sendo associado a *THPO* (DASOUKI; SAADI; AHMED, 2015). A CAMT é uma desordem rara caracterizada por trombocitemia e megacariocitopenia sem anormalidades físicas. Em aproximadamente 60% dos pacientes há evolução para pancitopenia ainda na infância. A medula óssea destes pacientes mostra acentuada hipoplasia com números reduzidos de megacariócitos (GEDDIS, 2011).

Com o conhecimento mais profundo da estrutura da trombopoietina e a melhoria dos métodos de purificação, foi possível criar estruturas sintéticas que mimetizam esse hormônio glicoprotéico, sendo o eltrombopag o mais conhecido. O eltrombopag não compete com a ligação ao *c-MPL*. Ao invés disso, interage com o domínio transmembrana, levando à ativação do *c-MPL* como resultado de uma

mudança conformacional (KIM et al., 2007). O eltrombopag é eficiente sobretudo no aumento do número de plaquetas em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (PTI); seu uso foi aprovado pela agência federal de regulação de medicamentos dos Estados Unidos (a FDA) em 2008 (HITCHCOCK, KAUSHANSKY; 2014).

Em 2013, uma mutação em *THPO* foi descrita em dois irmãos de uma família da Micronésia com trombocitopenia e AA (DASOUKI et al., 2013). A mutação em homozigose (*THPO* c.112C>T) leva a uma substituição no resíduo 17 de arginina por cisteína, excluindo o vigésimo primeiro aminoácido sinalizador da trombopoetina, localizado no domínio de ligação do receptor (DASOUKI et al., 2013). Segundo modelo *in vitro* utilizando células UT7-TPO (que requerem a *THPO* para reprodução), a introdução de uma quinta cisteína pode romper as pontes de dissulfeto normais, causando uma ligação pobre (DASOUKI et al., 2013).

Assim como os irmãos, os parentes heterozigotos para a mutação apresentaram contagens de plaquetas reduzidas e encurtamento telomérico (DASOUKI et al., 2013). Os resultados desse estudo demonstraram o envolvimento da trombopoetina na etiologia da AA, e ressaltaram a importância da investigação de mutações em *THPO* nos pacientes (DASOUKI et al., 2013).

Diante das evidências do estudo de Dasouki et al. (2013) em pacientes com AA congênita e da possibilidade de variantes no gene da trombopoetina também ocorrerem em pacientes com AA adquirida, propôs-se a realização do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Investigar a presença de variantes no gene *THPO* em pacientes com anemia aplástica adquirida

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Sequenciar o gene *THPO* em amostras de medula óssea de pacientes com anemia aplástica adquirida;
- ✓ Sequenciar o gene *THPO* em amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (controle);
- ✓ Verificar se há associação entre a presença de variantes genéticas em *THPO* e a contagem de plaquetas nos pacientes com anemia aplástica adquirida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo caso–controle para a investigação da presença de variantes no gene *THPO* em amostra não probabilística de medula óssea de pacientes com AA adquirida e sangue periférico de indivíduos saudáveis, previamente armazenadas no Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, no período de 2013 a 2015.

3.1 Amostras

A realização do estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP, processo nº 518/2015 (ANEXOS A e B). As amostras dos pacientes com AA adquirida (grupo caso) encontravam-se estocadas no referido laboratório em um banco de amostras de um estudo anterior aprovado pelo CEP-HCFMRP-USP, processo nº 7147/2005 (ANEXO C).

O banco foi formado por amostras de DNA (n=164) extraídas de medula óssea de pacientes do Ambulatório de Falências Medulares da Universidade Federal do Paraná (UFPR), coletadas, processadas e enviadas ao serviço do HCFMRP-USP. As amostras provêm de pacientes acompanhados desde o final da década de 1980, tendo sido coletadas entre os anos de 2003 e 2005. Do total de amostras, apenas 92 (56%) apresentaram quantificação de DNA adequada para serem submetidas ao sequenciamento. O critério de inclusão dos pacientes do grupo caso foi o diagnóstico de AA adquirida, independentemente de idade, gênero e raça.

Da mesma forma, foram analisadas 92 amostras de DNA extraídas de sangue periférico de indivíduos saudáveis quanto aos parâmetros hematológicos (grupo controle), igualmente coletadas para estudos anteriores com aprovação do CEP (ANEXO D). Assim, foram sequenciadas 92 amostras de DNA de medula óssea de pacientes com AA adquirida e 92 amostras de DNA de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

3.2 Revisão de Prontuários

Dados clínicos dos pacientes do grupo caso foram obtidos por meio de

consulta aos prontuários, no serviço de arquivo médico do Hospital das Clínicas da UFPR, em Curitiba, no período de março a junho de 2016. A revisão foi feita para se identificar sexo e idade no momento da admissão no serviço, bem como a evolução dos dados hematológicos referentes a hemoglobina, hematócrito, leucócitos e número de plaquetas durante o seguimento dos pacientes. Foram obtidos os valores disponíveis referentes ao hemograma no diagnóstico, durante o tratamento e mensalmente no acompanhamento dos pacientes do grupo caso até o óbito, alta ou perda do seguimento ambulatorial. Ao final desta etapa, constatou-se a ausência de informações de nove pacientes, que foram excluídos da amostra do grupo caso.

3.3 Sequenciamento de Sanger

As amostras de DNA foram diluídas em concentração de 50 ng/μL; as regiões correspondentes aos éxons do *THPO* foram amplificadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction* – PCR). Os iniciadores (*primers forward* e *reverse*) utilizados nas PCRs foram desenhados utilizando o programa Primer3, versão 4 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), a partir da sequência da isoforma 1 do gene *THPO* humano, com número de referência do NCBI NM_000460.2. O gene é composto por seis éxons, sendo que um par de *primers* foi desenhado para amplificar cada éxon, com exceção do éxon 6, em que quatro pares de *primers* foram desenhados para garantir sua cobertura (Tabela 3).

A concentração final dos reagentes na PCR foi de 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimerase, tampão 1×, 150 nM de cada *primer* e 100 ng de DNA genômico, em um volume final de reação de 25 μL. As condições de PCR utilizadas foram: 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial, e 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 55 a 62°C (a depender do *primer*, Tabela 3) por 45 segundos para anelamento e 72°C por 45 segundos para extensão.

Tabela 3 – Sequência dos *primers* específicos e condições para amplificação dos éxons do gene *THPO*

<i>Primer*</i>	Sequência (5' – 3')	Quantidade de bases	Ta** (°C)	%GC	Tamanho do produto de PCR
1 F	TATGACCTGCTGCTGTGGAG	20	60.0	55	177
1 R	GAGCCCATTTCTCTTTGCTG	20	59.9	50	
2 F	AATTCAGGGCTTTGGCAGTT	20	60.9	45	355
2 R	GCAGCGTGTCTCCTTTCTCT	20	59.7	55	
3 F	CCTGGGTTTCAGGTCTGG	18	59.0	61,1	298
3 R	GATGGTGTCTTCCTGGGAGT	20	58.9	55	
4 F	CACAATACAGCCCGCATTTA	20	59.6	45	287
4 R	AGAATCCATGGGAAGCAGTG	20	60.1	50	
5 F	TTCACCTCTGCTGGCTACTCCT	21	59.2	52,4	340
5 R	AAGAGCCCTTCTTCCCTCAG	20	59.9	55	
6A F	TGGGTACTGGCATCCTGTCT	20	60.5	55	414
6A R	AGGGACCTGGAGGTTTGGT	19	60.7	57,9	
6B F	AGCTCCCAAACAGGACTTCT	20	57.9	50	500
6B R	CGGCAGTGTCTGAGAACCTT	20	60.4	55	
6C F	CTACCAGCCCTCTTCTAAACAC	22	62.0	50	282
6C R	CTGCTCTGATGAGTATTGCTGATA	24	62.0	41,7	
6D F	AAAGGGAATCATTTTCACTGT	22	62.0	40,9	488
6D R	CTATTGCCACCCTCGAAGAA	20	62.0	50	

*Números representam os éxons; F = direção *forward*; R = direção *reverse*; quatro pares de *primers* foram desenhados para o éxon 6 (A a D);

**Ta = temperatura de anelamento.

Após a amplificação da região genômica correspondente de cada éxon do gene *THPO*, o produto das PCRs foi utilizado para a preparação das reações de sequenciamento. Para cada reação de sequenciamento utilizou-se 100 nM de *primers* (*forward* ou *reverse*, separadamente – Tabela 3), 1 µL de produto de PCR, 2 µL de 5× *Sequencing Buffer*, 1 µL de *BigDye Terminator v3.1 Reaction Mix* (ambos da Applied Biosystems), e H₂O para completar um volume final de reação de 5 µL. As condições para a reação de sequenciamento foram: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, e 35 ciclos de 95°C por 10 segundos, 51°C por 10 segundos e 60°C por 4 minutos. As reações foram submetidas a eletroforese capilar no aparelho *ABI 3500 XL Detection System* (Applied Biosystems). Os cromatogramas foram analisados no *software Sequencher*, versão 5.1 (Gene Code Corporation).

A base de dados *dbSNP Short Genetic Variations* do *National Center of*

Biotechnology Information (NCBI) foi utilizada para buscar informações acerca das variantes genéticas encontradas no sequenciamento.

3.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 19 (International Business Machines). Para a comparação da frequência de variantes genéticas nos dois grupos (pacientes com AA adquirida e indivíduos saudáveis) foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson. Para verificar se variantes em *THPO* influenciavam a produção plaquetária nos pacientes com AA, foram aplicados ou o teste paramétrico ANOVA (para variantes com três genótipos: selvagem, heterozigoto ou homozigoto) ou o teste t de Student (para variantes com dois genótipos: selvagem ou heterozigoto). Para todas as análises, foram considerados níveis de significância estatística iguais ou abaixo de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Características da Amostra de Pacientes

Do total de 92 pacientes que compuseram o estudo, foram obtidos dados clínicos hematológicos de 83, sendo a maioria do sexo masculino (59%), de adultos jovens, com média de 24,6 ($\pm 16,5$) anos. Nessa amostra, a média de hemoglobinas observadas foi de $7,2 \pm 0,4$, hematócritos de $20,8 \pm 3,1$ neutrófilos de 188 ± 158 e plaquetas de 2500 ± 707 , conforme apresentados na Tabela 4. Do total de 83 pacientes com informações disponíveis, ocorreram 25 óbitos, perfazendo 30% da amostra.

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes (n=83).

Características	
Sexo (%)	
Masculino	59
Feminino	41
Idade (anos)	$24,6 \pm 16,5$
Hemoglobina (g/dL)	$7,2 \pm 0,4$
Hematócrito (%)	$20,8 \pm 3,1$
Neutrófilos /mm³	188 ± 158
Plaquetas /mm³	2500 ± 707

4.2 SNPS no Gene *THPO*

O gene *THPO* possui seis éxons (Figura 1), dentre os quais o sexto é o maior deles que, para fins de sequenciamento, foi dividido em quatro partes. O sequenciamento do DNA de 92 amostras de medula óssea de pacientes com AA adquirida e de 92 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis possibilitou a detecção de três polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) nos éxons 2 e 6: rs956732, rs6141 e rs3804618 (Figura 1). Os SNPs foram encontrados tanto em pacientes quanto em controles.

Figura 1 - Representação linear da estrutura do gene *THPO* com a localização dos SNPs encontrados nos pacientes e indivíduos saudáveis

No éxon 2 foi observado o SNP rs956732 T>C. Tal variante apresenta a troca de citosina por timina na posição 80 (Figura 2). Esse SNP está descrito na base de dados dbSNP como benigno, com frequência alélica de 0,49 na população, de acordo com o *1000 Genomes*. No presente trabalho, a variante foi observada com frequência alélica de 0,6 nos pacientes e 0,7 nos controles. Trinta e seis por cento dos pacientes apresentaram a variante em homozigose, e 46% em heterozigose. Dentre os controles, 50% apresentaram a variante em homozigose, e 36% em heterozigose.

Figura 2 - Fragmento do cromatograma representando a região do éxon 2 em que foi observado o SNP rs956732 (assinalado no retângulo vermelho).

No éxon 6 foi observado o SNP rs6141 G>A. Tal variante apresenta a troca de adenina por guanina na posição 1312 (Figura 3). Esse SNP foi descrito na dbSNP como benigno, com frequência alélica de 0,35 segundo o *1000 Genomes*. Na coorte do presente trabalho, o SNP foi observado com frequência alélica de 0,7 em pacientes e indivíduos saudáveis. No grupo dos pacientes, 50% apresentaram a variante em homozigose e 41% em heterozigose. Entre os controles, em 56% a variante foi observada em homozigose, e 36% em heterozigose.

Figura 3 - Fragmento do cromatograma representando a região do éxon 6 em que foi observado o SNP rs6141 (assinalado no retângulo vermelho)

Também no éxon 6, foi encontrada a variante rs3804618 A>T, na qual a base adenina é substituída por timina na posição 1759, conforme exemplificado na Figura 4. O SNP foi descrito na dbSNP como benigno, com frequência alélica de 0,07, de acordo com *1000 Genomes*, valor próximo ao encontrado no presente trabalho (0,05 nos pacientes e 0,04 nos indivíduos saudáveis). A variante foi observada apenas em heterozigose em 10% dos pacientes, e em 7,6% dos controles.

Figura 4 - Fragmento do cromatograma representando a região do éxon 6 em que foi observado o SNP rs3804618 (assinalado no retângulo vermelho).

Nenhuma mutação (variante genética com frequência abaixo de 1% na população) foi encontrada na coorte do presente trabalho. As mesmas variantes do tipo SNP foram encontradas em ambos os grupos (pacientes e controles), e não houve diferença estatisticamente significativa entre suas frequências (Tabela 5).

Tabela 4 - SNPs e sua frequência alélica nas amostras dos pacientes com AA adquirida (grupo caso) e indivíduos saudáveis (grupo controle).

Genotipos	Pacientes (n=83)	Controles (n=92)	Valor de p
rs956732 T>C			
Homozigoto	30	46	
Heterozigoto	39	34	
Selvagem	14	12	
Frequencia alelica	0.6	0.7	
Teste de Chi quadrado			0.2
rs6141 G>A			
Homozigoto	42	52	
Heterozigoto	34	34	
Selvagem	7	6	
Frequencia alelica	0.7	0.7	
Teste de Chi quadrado			0.7
rs3804618 A>T			
Homozigoto	0	0	
Heterozigoto	8	7	
Selvagem	75	85	
Frequencia alelica	0.05	0.04	
Teste de Chi quadrado			0.6

4.3 SNPS e Evolução Quantitativa de Plaquetas

Após a obtenção das informações concernentes ao número de plaquetas dos pacientes, testes estatísticos foram aplicados para verificar se os genótipos observados pudessem exercer influências nessa característica. Conforme dados da Tabela 6, não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e a contagem de plaquetas durante o seguimento dos pacientes com AA adquirida.

Tabela 5 - SNPs e o número de plaquetas dos pacientes com AA adquirida.

SNPs	N	Média	DP	p
rs956732				
Selvagem	14	77913,02	53051,19	
Heterozigoto	39	83749,64	57021,46	
Homozigoto	30	65949,32	50928,46	0,403 [¥]
rs6141				
Selvagem	7	64266,78	29713,49	
Heterozigoto	34	73734,94	58428,74	
Homozigoto	42	80443,87	54293,66	0,721 [¥]
rs3804618				
Selvagem	75	75449,01	54219,88	
Heterozigoto	8	84602,73	56851,07	0,652 [§]

N – número de indivíduos com as variantes; Média – média do número de plaquetas de acordo com o grupo; DP – Desvio Padrão de acordo com o número de plaquetas; [¥] ANOVA, [§] teste t

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o gene *THPO* foi sequenciado em 83 pacientes com AA adquirida e em 92 indivíduos saudáveis, resultando na detecção de três SNPs (rs956732, rs6141 e rs3804618) em ambos os grupos, sem diferença estatística em suas frequências. Dessa forma, refutou-se a hipótese inicial de que alterações genéticas (mutações ou mesmo SNPs) em *THPO* são mais frequentes nos pacientes com AA adquirida.

Os SNPs, embora em éxons, não são responsáveis por substituição de aminoácidos na tradução da trombopoetina. O SNP rs956732 está localizado numa região não traduzida (UTR, do inglês *untranslated region*) na porção 5' do mRNA na isoforma NM_000460.3, e é uma variante sinônima na isoforma NM_001290003.1. Os SNPs rs6141 e rs3804618 estão localizados na porção 3' UTR do mRNA de *THPO*. Assim, a possibilidade de expressão clínica de tais variantes é pequena, se não nula. O fato de encontrarem-se em homozigose ou heterozigose tampouco parece alterar a sua influência em qualquer característica clínica dos pacientes. Como demonstrado no presente estudo, não há relação entre o número de plaquetas dos pacientes e a presença de SNPs.

A via *THPO-c-MPL* é uma via caracterizada pela presença da proteína MPL, encontrada em localização transmembrânica, com parte intracelular e parte extracelular. A trombopoetina, bem como os miméticos dela, ligam-se ao MPL na parte extracelular. Na parte intracelular, a MPL está ligada a JAK-2 que funciona, quando ativada, como estimulador de mensageiros como *Signal Transducer and activator of transcription* (STAT) e as fosfatidilinositol 3 – quinases (PI3K), que agem estimulando o núcleo e controlando, entre outros mecanismos, o ciclo celular, anti-apoptose e a expressão gênica (NANGALIA, J.; GREEN, A.R., 2017).

A importância da via *THPO-c-MPL* na fisiopatologia da AA vem sendo cada vez mais evidenciada (OLNES et al., 2012). Distúrbios nessa via podem levar a alterações nas contagens de linhagens hematopoéticas, sobretudo trombocitopenia (KUTER, 2006). Algumas proteínas que participam dessa via também participam da via da Janus Kinase (*JAK2*) e foram ligadas a presença de alterações genotípicas e/ou fenotípicas correlacionadas a diferentes patologias exemplificadas com as alterações descritas a seguir (DASOUKI; SAADI; AHMED, 2015).

Alterações em *THPO* foram relacionadas a presença de trombocitemia e AA. Uma mutação (c.112 C>T, p.R17C) foi descrita em uma família com AA congênita (DASOUKI et al., 2013). Além disso, mutações no gene receptor da

trombopoetina, *c-MPL* (c1248 G>A p.W416X e c.1180 C>T p.P394S), foram encontradas em pacientes com AA ou CAMT (FORBES et al., 2011).

Por fim, mutações somáticas foram descritas na Calreticulina, ligadas as patologias como mielofibrose e outras doenças mieloproliferativas bem como em pacientes com baixa contagem plaquetária, encontradas no cromossomo 19. Assim como também foi encontrada mutação somática na Janus Kinase 2 (JAK 2) relacionada sobretudo a policitemia vera, trombocitemia essencial e Síndrome de Budd-Chiari (FORBES et al., 2011).

Walne et al. (2012) descreveu mutações no gene *c-MPL* em uma família com falência medular congênita. De maneira semelhante aos resultados do presente trabalho, Wang et al. (2012) sequenciou *c-MPL* em 84 crianças japonesas com AA adquirida e detectou SNPs que não pareciam ter ligação direta com a fisiopatologia da doença.

O estudo de Dasouki et al. (2013), que evidenciou a mutação c.112C>T, R17C no gene *THPO* em pacientes com AA congênita, sugere que mutações nesse gene podem ser etiológicos na AA e merecem investigação mais aprofundada. Olnes et al. (2012) investigou a resposta clínica em alguns pacientes, sugerindo que a AA adquirida causada por mutações em *THPO* pode ser mais comum e responsiva a terapia com análogos da trombopoetina (DASOUKI; SAADI; AHMED, 2015).

Assim como foi demonstrado que pacientes com AA adquirida e congênita apresentam relações com alterações teloméricas em muitos casos, parece cada vez mais evidente que a via *THPO-c-MPL* apresenta-se alterada nesses pacientes (DASOUKI; SAADI; AHMED, 2015).

Seo et al em 2017 detectou por fim, mutações no gene *THPO* em irmãos comprovando alterações na ação da THPO uma vez demonstrados que os pacientes portadores da mutação não tinham boas respostas ao transplante. As mutações, denominadas THPO R99W e THPO R157 foram descritas também em indivíduos provindos de casamentos onde havia parentesco de primeiro grau entre os pais (SEO et al 2017).

A análise dos resultados do presente trabalho também não mostrou associação entre presença de variantes gênicas e as variáveis gênero, raça, idade e tipo de tratamento de pacientes. Em síntese, os resultados deste estudo não esgotam o assunto, uma vez que a fisiopatologia da doença está ainda por ser elucidada, tendo a trombopoetina um papel pouco claro. A associação da interação

com outras vias e mesmo a correlação com outros genes que a princípio não tem ligação direta com a *THPO* poderiam trazer dados importantes na compreensão da patologia.

A presença das variantes encontradas tanto em controles quanto em pacientes podem ter relação direta com a variedade étnica que compõe a população estudada, sendo possível desta maneira uma justificativa ao resultado obtido a ser explorada em futuros estudos uma vez que nenhum dos estudos anteriormente realizados com intuito semelhante abordou uma população tão diversa etnicamente.

Outra abordagem de interesse seria a investigação do ligante da trombopoetina na célula hematopoiética, o c-MPL, nas mesmas amostras. A possibilidade de sequenciamento do *c-MPL* traria uma elucidação maior do binômio descrito na patologia da AA adquirida.

Distúrbios na via *THPO-c-MPL* foram relacionados à fisiopatologia de doenças mieloproliferativas causando, principalmente, aumento plaquetário nos pacientes (DASOUKI; SAADI; AHMED, 2015). A mutação mais frequente em *c-MPL* leva à substituição W515L na região de ligação transmembrana da proteína, levando a trombocitemia essencial e mielofibrose. As mutações ocorrem tanto em homozigose quanto em heterozigose nessas doenças (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que nossa coorte de pacientes com AA adquirida não apresenta alterações genéticas na trombopoetina que possam ser associadas à fisiopatologia da doença. Entretanto, a busca por variantes genéticas em outros membros da via *THPO-MPL* pode ser promissora para a identificação de proteínas alteradas que contribuam para o desenvolvimento da AA adquirida.

6 CONCLUSÃO

O sequenciamento do gene *THPO* em pacientes com AA adquirida e em indivíduos saudáveis levou à identificação de três SNPs em regiões não-traduzidas, e em frequências semelhantes em ambos os grupos. Os pacientes com esses SNPs não apresentaram alterações em seus números de plaquetas, sugerindo que tais SNPs não exercem influência na função de regulação plaquetária da trombopoetina.

REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- BACIGALUPO, A. et al. Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anaemia (SAA): a report of the EBMT SAA working party. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 70, n. 2, p. 177-182, 1988.
- BARTLEY, T. D. et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. **Cell**, Cambridge, v. 77, n. 7, p. 1117-1124, 1994.
- BHATNAGAR, N.; WYNN, R.; VELANGI, M. Upfront matched and mismatched unrelated donor transplantation in paediatric idiopathic severe aplastic anaemia: A United Kingdom multi-centre retrospective experience. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 49, p. 0004a, 2014. Supplement 1.
- CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere diseases. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 361, n. 24, p. 2353-2365, 2009.
- CAMITTA, B. M. et al. Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality. **Blood**, New York, v. 48, n. 1, p. 63-70, 1976.
- DASOUKI, M.; SAADI, I.; AHMED, S. O. *THPO-MPL* pathway and bone marrow failure. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, Riyadh, v. 8, n. 1, p. 6-9, 2015.
- DASOUKI, M. J. et al. Exome sequencing reveals a thrombopoietin ligand mutation in a Micronesian family with autosomal recessive aplastic anemia. **Blood**, New York, v. 122, n. 20, p. 3440-3449, 2013.
- DE LATOUR, R. P. et al. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. **Blood**, New York, v. 116, n. 20, p. 4175-4184, 2010.
- FEENE, M. D. et al. Structure of the receptor-binding domain of human thrombopoietin determined by complexation with a neutralizing antibody fragment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 7, p. 1816-1821, 2004.
- FORBES, S. A. et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, p. D945-D950, 2011. Database issue. Disponível em: <<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>>. Acesso em: 13 jun.2017.
- FORBES, S. A. et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue): D945–50. Available from: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>
- GEDDIS, A. E. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. **Pediatric Blood & Cancer**, Hoboken, v. 57, n. 2, p. 199-203, 2011.
- HARKER, L. A. et al. Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman

primates. **Blood**, New York, v. 88, n. 2, p. 511-521, 1996.

HITCHCOCK, I. S.; KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin from beginning to end. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 165, n. 2, p. 259-268, 2014.

KIM, M. J. et al. NMR structural studies of interactions of a small, nonpeptidyl Tpo mimic with the thrombopoietin receptor extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 19, p. 14253-14261, 2007.

KOCHENDERFER, J. N. et al. Loss of T- lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. **Blood**, New York, v. 100, n. 10, p. 3639-3645, 2002.

KORDASTI, S. et al. Functional characterization of CD4+ T cells in aplastic anemia. **Blood**, New York, v. 119, n. 9, p. 2033-2043, 2012.

KUTER, D. J. Milestones in understanding platelet production: a historical overview. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 165, n. 2, p. 248-258, 2014.

LOCASCIULLI, A. et al. Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group. Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). **Haematologica**, Pavia, v. 92, n. 1, p. 11-18, 2007.

MELICHER, D.; BUZAS, E. I.; FALUS, A. Genetic and epigenetic trends in telomere research: a novel way in immunoepigenetics. **Cellular and Molecular Life Sciences**: CMLS, Basel, v. 72, n. 21, p. 1-15, 2015.

MIANO, M.; DUFOUR, C. The diagnosis and treatment of aplastic anemia: a review. **International Journal of Hematology**, Amsterdam, v. 101, n. 6, p. 527-535, 2015.

MITCHELL, J. R.; WOOD, E.; COLLINS, K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. **Nature**, London, v. 402, n. 6761, p. 551-555, 1999.

NAKAO, S. et al. Isolation of a T-cell clone showing HLA-DRB1*0405-restricted cytotoxicity for hematopoietic cells in a patient with aplastic anemia. **Blood**, New York, v. 89, n. 10, p. 3691-3699, 1997.

NANGALIA, J.; GREEN, A.R. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. **Blood**, New York, v. 130, n. 23, p. 2475-2483, 2017.

OLNES, M. J. et al. Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 367, n. 1, p. 11-19, 2012.

PEARCE Jr, K .H. et al. Mutational analysis of thrombopoietin for identification of

receptor and neutralizing antibody sites. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 33, p. 20595-20602, 1997.

SCHEINBERG, P.; YOUNG, N. S. How I treat acquired aplastic anemia. **Blood**, New York, v. 120, n. 6, p. 1185–1196, 2012.

SCHEINBERG, P. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. **Haematologica**, Pavia, v. 95, n. 7, p. 1075-1080, 2010.

SEO, A. et al. Bone marrow failure unresponsive to bone marrow transplant is caused by mutations in thrombopoietin **Blood**, New York, v. 130, n. 7, p. 875-880, 2017.

SONG, E. Y. et al. Association of human leukocyte antigen class II alleles with response to immunosuppressive therapy in Korean aplastic anemia patients. **Human Immunology**, New York, v. 71, n. 1, p. 88-92, 2010.

TICHELLI, A. et al. A randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia receiving antithymocyte globulin (ATG), cyclosporine, with or without G-CSF: a study of the SAA Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Blood**, New York, v. 117, n. 17, p. 4434-4441, 2011.

VAINCENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, New York, v. 129, n. 6, p. 667-679, 2017.

WALNE, A. J. et al. Exome sequencing identifies *MPL* as a causative gene in familial aplastic anemia. **Haematologica**, Pavia, v. 97, n. 4, p. 524-528, 2012.

WANG, X. et al. Mutation in the *THPO* gene is not associated with aplastic anemia in Japanese children. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. 548-558, 2012.

WLODARSKI, M. W. et al. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. **Blood**, New York, v. 108, n. 8, p. 2632-2641, 2006.

YOUNG, N. S.; CALADO, R. T.; SCHEINBERG, P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. **Blood**, New York, v. 108, n. 8, p. 2509–2519, 2006.

ZANELLI, E.; BREEDVELD, F. C.; DE VRIES, R. R. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? **Rheumatology (Oxford)**, v. 39, n. 10, p. 1060-1066, 2000.

ZENG, W. et al. Limited heterogeneity of T cell receptor BV usage in aplastic anemia. **Journal of Clinical Investigation**, New Heaven, v. 108, n. 5, p. 765-773, 2001.

ZENG, Y.; KATSANIS, E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 180, n. 3, p. 361-370,

2015.

ANEXO A - Projeto de Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

PROJETO DE PESQUISA

Ribeirão Preto, 12 de novembro 2014.

Ilustríssima Senhora
Dr.^a Marcia Guimarães Villanova
MD, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Sistema UPC nº 8032

Senhora Coordenadora,

Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado

Análise da presença da mutação R38C dos
receptores THPO/MPL em 200 amostras de pacientes
com anemia aplástica adquirida,

juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.

O projeto acima mencionado será desenvolvido no (a) departamento de
clínica médica

Informo também que o pesquisador responsável e o orientador possuem currículo Lattes.

O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi Aprovado.

Equipe Técnica UPC

Atenciosamente,

Pedro Henrique Padilha
Pesquisador Principal ou Aluno (nome completo e assinatura)

Aparecida Elaine Girolinotto da Silva
Escriturária
Matrícula 4998

Prof. Dr. RODRIGO T. CALADO
Supervisor e Coordenador do
Laboratório de Hematologia
Pesquisador Principal ou Orientador (nome completo e assinatura)

De acordo:

Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos
Suplente da Chefe do
Departamento de Clínica Médica
Chefe de Departamento (assinatura e carimbo)

Prof. Dr. EDUARDO MAGALHÃES REGO
Chefe da Divisão de Hematologia
e Hemoterapia
Chefe de Ambulatório/ Laboratório (assinatura e carimbo)

Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.

Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
Fone: (16) 3602-2632 FAX: 3602-2962

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 03 de fevereiro de 2015

Ofício nº 403/2015
CEP/MGV

CÓPIA

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado “ANÁLISE DA PRESENÇA DA MUTAÇÃO R38C DOS RECEPTORES THPO/MPL EM 200 AMOSTRAS DE PACIENTES COM ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA”, foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 518/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

PEDRO HENRIQUE PADILHA

PROF.DR. RODRIGO DO TOCANTINS CALADO DE SALOMA RODRIGUES

Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO C – Solicitação ao Comitê de Ética e Pesquisa

CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2005

Ofício nº 1762/2005
CEP/SPC

Senhor Professor:

O Comitê de Ética em Pesquisa recebeu carta, onde Vossa Senhoria encaminha a proposta de criação e reconhecimento de um banco de amostras de sangue e medula óssea no Laboratório de Hematologia.

Sobre o assunto, o Comitê de Ética em Pesquisa em sua 204ª Reunião Ordinária realizada em 20.06.2005, analisou a proposta de criação e a enquadrou na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 7147/2005.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO FERREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. ROBERTO PASSETTO FALCÃO
DR. ANDRÉ MARINATO (Pesquisador)
Depto. de Clínica Médica – Laboratório de Hematologia
Em mãos

ANEXO D – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 29 de fevereiro de 2012

Ofício nº 724/2012
CEP/MGV

Prezado Pesquisador,

O trabalho intitulado **"UTILIZAÇÃO DO MÉTODO FLOW-FISH NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DOS TELÔMEROS: SÍNDROME DE FALÊNCIA MEDULAR E FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 340ª Reunião Ordinária realizada em 27/02/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, versão 1.1 de 13 de fevereiro de 2012**, de acordo com o Processo HCRP nº 12050/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente,

DR.ª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor

RODRIGO DO TOCANTINS CALADO DE SALOMA RODRIGUES

Depto. de Clínica Médica - Hematologia