UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão das moléculas da via Hippo em neoplasias mieloproliferativas

Maira da Costa Cacemiro

Ribeirão Preto
2018

Expressão das moléculas da via Hippo em neoplasias mieloproliferativas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientanda: Maira da Costa Cacemiro

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 23/08/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

Ficha Catalográfica

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.

Cacemiro, Maira da Costa

Expressão das moléculas da via Hippo em neoplasias mieloproliferativas.

Ribeirão Preto, 2018.

p.138 : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Castro, Fabíola Attié.

1.Neoplasias Mieloproliferativas, 2. Via Hippo, 3. Apoptose, 4. Citocinas.

Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP #2014/04234-9, #2016/03265-3.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CACEMIRO, M. C.

Expressão das moléculas da via Hippo em neoplasias mieloproliferativas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Rosângela e Sebastião, por me ensinarem o valor do trabalho e a sempre persistir em busca dos meus sonhos.

Ao meu irmão Rafael e meu marido Pablo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela sua presença constante na minha vida, iluminando meus sonhos e guiando meus passos.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiola Attié de Castro, por me receber e permitir que eu fizesse parte de seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pela paciência e principalmente pelos ensinamentos.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho Juçara, Maria Gabriela e Sandra, pela troca de experiências, tanto profissionais, quanto pessoais, pela cumplicidade e ajuda no trabalho e na vida.

Ao Dr. Luiz Miguel Pereira e à profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui.

Às profa. Dras. Belinda Pinto Simões, Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes e Fabiola Traina pela parceria no HC-FMRP-USP e de dados clínicos de pacientes.

Aos pacientes e doadores voluntários (grupo controle) que contribuíram com as amostras para a realização desse projeto.

Ao Dr. William Vainchenker, Dra. Isabelle Plo e Dra. Caroline Marty que me receberam, me supervisionaram e me ensinaram muito no Institut Gustave Roussy - Villejuif.

Epígrafe

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar”. Chico Xavier

Resumo

Cacemiro, M.C. Expressão das moléculas da via Hippo em neoplasias mieloproliferativas. 2018. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) são doenças hematológicas caracterizadas pela proliferação aumentada e acúmulo de células mieloides maduras de uma ou mais séries hematopoéticas: granulocítica, eritrocítica, megacariocítica ou mastocítica. Os pacientes com NMP podem apresentar mutações como a JAK2V617F, MPL e CALR, cujas descrições foram fundamentais para o início da elucidação da fisiopatologia das NMP. As células neoplásicas das NMP apresentam resistência à apoptose e proliferação celular exacerbada. Sabe-se ainda que essas doenças são consideradas oncoinflamatórias e pré-leucêmicas. Apesar de todos esses conhecimentos sobre os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patogênese das NMP, não há até a presente data tratamentos eficazes que curam ou alteram a história natural de progressão dessas desordens para LMA. Pelo exposto, foi aqui investigada a potencial participação dos membros da via de sinalização Hippo na fisiopatologia das NMP *BCR-ABL1* negativas mais frequentes, a policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MF). A via de sinalização Hippo foi descrita como supressora de tumor e é uma das responsáveis pela regulação da proliferação, diferenciação e morte celular. Foi analisada, ainda nesse estudo, a correlação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo com o perfil de citocinas plasmáticas dos pacientes com PV, TE e MF, a associação com o “status mutacional” e com a expressão dos genes que regulam a apoptose celular pela via intrínseca. Os principais achados nos pacientes com PV foram a diminuição da expressão dos genes supressores de tumor *LATS2*, *MST1* e *MST2* acompanhada pela presença de elevada concentração de citocinas pró-inflamatórias e fenótipo de resistência a apoptose. Na TE, os dados relevantes foram a detecção da diminuição da expressão dos genes supressores de tumor *LATS1*, *LATS2*, *MST1* e *SAVI*, e a observação da relação entre alta expressão dos genes *SAVI* e *MOB1B* e a mutação da CALR. Em MF destaca-se a redução da expressão dos genes *SAVI* e *TAZ* da via de sinalização Hippo e do gene *AURKB* do ciclo celular. Em conclusão, os dados indicam que a diminuição da expressão dos genes supressores de tumor da via Hippo contribui para a fisiopatologia e para o fenótipo de resistência das células neoplásicas à apoptose das NMP.

Palavras Chave: Neoplasias Mieloproliferativas; via Hippo; apoptose; citocinas

Abstract

Cacemiro, M.C. Expression of Hippo pathway molecules in myeloproliferative neoplasms. 2018. Thesis (Doctorate). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are hematological disorders characterized by increased proliferation of mature myeloid cells of one or more hematopoietic series: granulocytic, erythrocytic, megakaryocytic or mastocytic. Patients with MPN may present mutations such as JAK2V617F, MPL and CALR, which were essential descriptions for the beginning of pathophysiological elucidation of MPN. The NMP neoplastic cells show resistance to apoptosis and exacerbated cell proliferation. It is known that these entities are considered also oncoinflammatory and pre-leukaemic. Despite all this knowledge about the molecular and cellular mechanisms involved in the pathogenesis of MPN, there are no effective treatments that cure or alter the natural history of progression of these disorders to AML. For the above, a participatory potential of the Hippo signaling pathway members in the pathophysiology of the most frequent negative *BCR-ABL1* MPN, the polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) were investigated. The Hippo signaling pathway has been described as tumor suppressor and is responsible for the regulation of proliferation, differentiation and cell death. The correlation analysis of the expression levels of the Hippo pathway genes with the plasma cytokine profile of patients with PV, ET and PMF, the association with the mutational status and the expression of the genes that regulate intrinsic cellular apoptosis were performed. The main findings in patients with PV were decreased expression of the tumor suppressor genes *LATS2*, *MST1* and *MST2* accompanied by the presence of high concentration of proinflammatory cytokines and phenotype of resistance to apoptosis. In ET, relevant data were the detection of decreased expression of the tumor suppressor genes *LATS1*, *LATS2*, *MST1* and *SAVI*, and the observation of the relationship between high expression of the *SAVI* and *MOB1B* genes and the mutation of the CALR. In PMF, stands out the reduction of the *SAVI* and *TAZ* gene expression of the Hippo signaling pathway and the *AURKB* gene of the cell cycle. In conclusion, the data indicate that decreased expression of the tumor suppressor genes of the Hippo pathway contributes to the pathophysiology and neoplastic cell resistance phenotype to the apoptosis of MPN.

Keywords: Myeloproliferative Neoplasms; via Hippo; apoptosis; cytokines

Resumen

Cacemiro, M.C. Expresión de las moléculas de la vía Hippo en neoplasias mieloproliferativas. 2018. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) son enfermedades hematológicas caracterizadas por la proliferación creciente y la acumulación de células mieloides maduras de una o más series hematopoyéticas: granulocítica, eritrocítica, megacariocítica o mastocítica.

Los pacientes con NMP pueden presentar mutaciones como la JAK2V617F, MPL y CALR, cuyas descripciones fueron fundamentales para el inicio de la elucidación fisiopatología de las NMP. Las células neoplásicas de las NMP presentan resistencia a la apoptosis y proliferación celular exacerbada. Se sabe que estas enfermedades se consideran oncoinflamatorias y pre-leucémicas. A pesar de todos estos conocimientos sobre los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la patogénesis de las NMP, no hay hasta la fecha tratamientos eficaces que curan o alteran la historia natural de progresión de esos desórdenes hacia LMA.

Por lo expuesto, se investigó la potencial participación de los miembros de la vía de señalización Hippo en la fisiopatología de las NMP *BCR-ABL1* negativas más frecuentes, la policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MF). La vía de señalización Hippo fue descrita como supresora de tumor y es una de las responsables por la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular. En este estudio se analizó la correlación de los niveles de expresión de los genes de la vía Hippo con el perfil de citocinas plasmáticas de los pacientes con PV, TE y MF, la asociación con el "status mutacional" y con la expresión de los genes que regulan la apoptosis celular por la vía intrínseca. Los principales hallazgos en los pacientes con PV fueron la disminución de la expresión de los genes supresores de tumor *LATS2*, *MST1* y *MST2* acompañada por la presencia de elevada concentración de citocinas pro-inflamatorias y fenotipo de resistencia a la apoptosis. En la TE, los datos relevantes fueron la detección de la disminución de la expresión de los genes supresores de tumor *LATS1*, *LATS2*, *MST1* y *SAVI*, y la observación de la relación entre alta expresión de los genes *SAVI* y *MOB1B* y la mutación de la CALR. En MF se destaca la reducción de la expresión de los genes *SAVI* y *TAZ* de la vía de señalización Hippo y del gen *AURKB* del ciclo celular. En conclusión, los datos indican que la disminución de la expresión de los genes supresores de tumor de la vía Hippo contribuye a la fisiopatología y al fenotipo de resistencia de las células neoplásicas a la apoptosis de las NMP.

Palabras Clave: Neoplasias Mieloproliferativas; señalización Hippo; apoptosis; citoquinas

Lista de Figuras

Figura 1 - Cascata de sinalização da via Hippo em mamíferos _____	p.12
Figura 2 - Fluxograma dos ensaios experimentais realizados _____	p.19
Figura 3 - PCR para a pesquisa da mutação CALR em amostras de DNA de pacientes com NMP _____	p.28
Figura 4 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em células CD34 ⁺ de pacientes com PV e indivíduos controles _____	p.35
Figura 5 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular nos leucócitos de pacientes com PV e indivíduos controles. _____	p.36
Figura 6 - Correlação negativa entre os níveis de expressão do gene <i>LATS2</i> e o número de plaquetas em pacientes com PV _____	p.39
Figura 7 - Níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos leucócitos de pacientes com PV e controles _____	p.40
Figura 8 - Correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular com a expressão do gene pró-apoptótico <i>BAD</i> em pacientes com PV _____	p.42
Figura 9 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular nas células CD34 ⁺ de pacientes com TE e indivíduos controles _____	p.45
Figura 10 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular nos leucócitos de pacientes com TE e indivíduos controles. _____	p.46
Figura 11 - Expressão dos genes <i>SAVI</i> , <i>MOB1B</i> e <i>AURKB</i> em leucócitos de pacientes com TE positivos conforme o <i>status</i> mutacional _____	p.48
Figura 12 - Níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos leucócitos de pacientes com TE e CTRL _____	p.52
Figura 13 - Correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular e a expressão do gene pró-apoptótico <i>BAD</i> em pacientes com TE _____	p.54
Figura 14 - Níveis de Expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular nas células CD34 ⁺ de pacientes com MF e indivíduos controles _____	p.57
Figura 15 - Níveis de Expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em leucócitos de pacientes com MF e indivíduos controles _____	p.58
Figura 16 - Comparação dos níveis de expressão do gene <i>MST1</i> entre pacientes positivos e negativos para a mutação JAK2V617F em leucócitos de pacientes com MF _____	p.60

Figura 17 - Comparação dos níveis de expressão do gene <i>AURKA</i> entre pacientes positivos e negativos para a mutação <i>CALR</i> em leucócitos de pacientes com MF	p.60
Figura 18 - Comparação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular entre pacientes positivos para as mutações <i>JAK2V617F</i> e <i>CALR</i>	p.60
Figura 19 - Correlação entre a expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular com os dados laboratoriais dos pacientes com MF	p.63
Figura 20 - Níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos leucócitos de pacientes com MF e CTRL	p.65
Figura 21 - Correlação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular com dados laboratoriais dos pacientes com MF	p.67
Figura 22 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em células <i>CD34⁺</i> de pacientes com PV, TE e MF	p.69
Figura 23 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular nos leucócitos de pacientes com PV, TE e MF	p.70
Figura 24 - Níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas em pacientes com neoplasias mieloproliferativas e indivíduos saudáveis	p.72
Figura 25 - Influência do status da mutação <i>JAK2V617F</i> na produção de IP-10 em pacientes com MF	p.74
Figura 26 - Os biomarcadores imunológicos apresentam interação sistêmica anormal em pacientes com neoplasias mieloproliferativas	p.75
Figura 27 - Os diagramas em preto e branco representam produtores altos (preto) e baixos (branco) de cada citocina/quimiocina (<i>GM-CSF</i> , <i>IFN-α</i> , <i>IFN-γ</i> , <i>IL-1β</i> , <i>IL-4</i> , <i>IL-5</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-10</i> , <i>IL-12p70</i> , <i>IL-17A</i> , <i>IP-10</i> , <i>MCP-1</i> , <i>MIP-1α</i> , <i>MIP-1β</i> , <i>RANTES</i> e <i>TNF-α</i>), nos quatro diferentes grupos	p.77
Figura 28 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e parâmetros hematológicos em pacientes com mielofibrose primária	p.79
Figura 29 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e dados hematológicos em pacientes com policitemia vera	p.80
Figura 30 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e dados hematológicos em pacientes com trombocitemia essencial	p.81
Figura 31 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em pacientes com mielofibrose primária	p.83
Figura 32 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e os níveis expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em pacientes com policitemia vera	p.85

Figura 33 - Representação esquemática dos principais resultados relacionados à desregulação da via Hippo e sua associação com os genes da apoptose_____p.96

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Critérios de diagnóstico para Policitemia Vera de acordo com a Classificação da Organização Mundial da Saúde – 2016_____	p.3
Tabela 2 - Critérios de diagnóstico para Trombocitemia Essencial de acordo com a Classificação da Organização Mundial da Saúde – 2016_____	p.4
Tabela 3 - Critérios de diagnóstico para Mielofibrose Primária de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde – 2016_____	p.5
Tabela 4 - Sondas TaqMan utilizadas nos ensaios de quantificação da expressão gênica dos genes alvo da via Hippo e dos genes de referência (<i>GAPDH</i> e <i>BETA-ACTINA</i>) _____	p.26
Tabela 5 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de quantificação da expressão gênica dos genes alvo e genes de referência (<i>GAPDH</i> e <i>BETA-ACTINA</i>)_____	p.26
Tabela 6 - Dados demográficos e <i>status</i> mutacional dos pacientes com NMP e controles_____	p.33
Tabela 7 - Valores das medianas e do p obtidos nas análises comparativas dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em células CD34 ⁺ e leucócitos de controles e pacientes com PV _____	p.34
Tabela 8 - Resultados das análises de correlação entre a expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular com a idade e gênero de pacientes com PV _____	p.37
Tabela 9 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular e dados laboratoriais em pacientes com PV _____	p.38
Tabela 10 - Resultados das análises comparativas entre os níveis de expressão dos genes pró- e anti - apoptóticos em leucócitos do sangue periférico de controles e pacientes com PV _____	p.40
Tabela 11 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular com os níveis de expressão de genes pró e anti apoptóticos em pacientes com PV _____	p.41
Tabela 12 - Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em células CD34 ⁺ e leucócitos de indivíduos controles e pacientes com TE _____	p.44
Tabela 13 - Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular nos leucócitos de pacientes com TE conforme <i>status</i> mutacional_____	p.47
Tabela 14 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em leucócitos de pacientes com TE, idade e gênero _____	p.49
Tabela 15 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em leucócitos de pacientes com TE e parâmetros hematológicos _____	p.50

Tabela 16 - Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos leucócitos de controles e pacientes com TE _____	p.51
Tabela 17 - Resultados das análises de correlação e valores de p entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular e genes pró e anti-apoptóticos em leucócitos de pacientes com TE _____	p.53
Tabela 18 - Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em leucócitos e células CD34 ⁺ entre controles e pacientes com MF _____	p.56
Tabela 19 - Comparação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em leucócitos de pacientes com MF conforme <i>status</i> mutacional _____	p.59
Tabela 20 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular dos leucócitos de pacientes com MF e a idade e gênero _____	p.61
Tabela 21 - Correlação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular de leucócitos de pacientes com MF com os dados laboratoriais _____	p.62
Tabela 22 - Resultados das análises comparativas de níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos em leucócitos de controles e pacientes com MF _____	p.64
Tabela 23 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em leucócitos de pacientes com MF e expressão de genes pró e anti-apoptóticos _____	p.66
Tabela 24 - Correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular de leucócitos de pacientes com MF _____	p.82
Tabela 25 - Correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular de leucócitos de pacientes com PV _____	p.84
Tabela 26 - Correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular de leucócitos de pacientes com TE _____	p.86

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABL1 - Abelson tyrosine-protein kinase 1
ACD - acid citrate dextrose
ASPP1 - apoptosis-stimulating protein of p53 1
ASXL1 - Additional Sex Combs Like 1
ATP - Adenosine Triphosphate
AURK – Aurora Kinase
BAD - BCL2-associated agonist of cell death
BAG - Bcl-2 associated athanogenes
BAK - BCL2-antagonist/killer
BAX - BCL2-associated X protein
BCA - Bicinchoninic Acid
BCL-2 - B-cell CLL/lymphoma 2
BCL-10 - B-cell CLL/lymphoma 10
BCL-X - B-cell lymphoma-extra
BCL-XL - B-cell lymphoma-extra large
BCL-XS - B-cell lymphoma-extra small
BCL-W - B-cell lymphoma wedding
BCR-ABL1 - Oncogene de fusão
BID - BH3 interacting-domain death agonist
BIK - BCL2 Interacting Killer
BIM - Bcl-2-like protein 11
BIRC - Baculoviral IAP Repeat Containing
BLK - B lymphoid tyrosine kinase
BSA - Bovine Serum Albumine
C-MYC - Myc proto-oncogene protein
CALR – Calreticulina
CBL - Casitas B-lineage Lymphoma
CD4 - Cluster of Differentiation 4
CD34 – Cluster of Differentiation 34
CD41 - Cluster of Differentiation 41
cDNA - Complementary Desoxirribunucleic Acid
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CFSE - Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Media
CO₂ – Dioxido de Carbono
Ct - Cycle Threshold
CTGF - Connective Tissue Growth Factor
CTRL – Controle ou controles
CXCL12 - C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CYR61 - Cysteine-rich Angiogenic Inducer 61
dDelta Ct – Delta Delta Cycle Threshold
DDIT4 - DNA-damage-inducible transcript 4
DISC - Death-inducing signaling complex
DIPSS - Dynamic International Prognostic Score System
DMSO - Dimetilsufóxido
DNA- Desoxiribonucleic acid
DNMT3A - DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Dr. - Doutor
Dra. - Doutora
EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid
et al. - et alii
Epo – Eritropoetina
EPOR - Erythropoietin Receptor
ERK - Extracellular Signal-Regulated Kinases
F - Forward
FADD - Fas-associated protein with death domain
FASL - Fas Ligand
FASR - Fas Receptor
FDA - Food and Drug Administration
FCFRP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FGF1 - Fibroblast Growth Factor 1
FITC - Fluorescein Isothiocyanate
FLT3 - FMS-like Tyrosine Kinase 3
FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
g - Gravity

GM-CSF - Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GRB2 - Growth Factor Receptor-Bound Protein 2

GB – Glóbulos Brancos

GPCR - G protein-coupled receptors

GV – Glóbulos Vermelhos

h – Horas

Hb - Hemoglobina

HC - Hospital das Clínicas

HCL – Ácido Clorídrico

HCM – Hemoglobina Corpuscular Media

HFS - Hypotonic Fluorescent Solution

Ht - Hematócrito

HIV – Human Immunodeficiency Virus

HU – Hidroxiuréia

IDH1/2 - Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2

IFN- α - Interferon Alfa

IFN- γ - Interferon- gama

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-3 – Interleucina- 3

IL-4 – Interleucina- 4

IL-5 – Interleucina- 5

IL-6 – Interleucina- 6

IL-10 – Interleucina- 10

IL-12p70 – Interleucina 12 subunidade 70

IL-17A – Interleucina- 17A

IFN- α – Interferon- alfa

Ig – Imunoglobulina

IGF-1 - Insulin-like Growth Factor 1

INCENP - Inner centromere protein

IPSS - International Prognostic Scoring System

IRF3 - Interferon regulatory factor 3

JAK2 – Janus Kinase 2

KDa – Kilodaltons

L – Litro

LATS - Large Tumor Suppressor Gene
 LDH – Lactato Desidrogenase
 LEC - Leucemia Eosinofílica Crônica
 LIM - Lin11, Isl-1 & Mec-3
 LMA – Leucemia Mieloide Aguda
 LMC - Leucemia Mielóide Crônica
 LNC - Leucemia Neutrofílica Crônica
 LNK - Lymphocyte Adapter Protein
 Log10 - Logaritmo na base 10
 M - Mastocitose
 M - Molar
 MAP - Mitogen Activated Protein
 MCAK - microtubule depolymerase mitotic centromere-associated kinesin
 MCL-1 - Myeloid Cell Leukemia 1
 MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein-1
 MIP-1 - Macrophage Inflammatory Proteins
 Med – Mediana
 MF – Mielofibrose Primária
 MgCl2 - Cloreto de Magnésio
 MI - Mesilato de Imatinibe
 mL - Mililitros
 MM -Mieloma Múltiplo
 mM - Mili Molar
 MOB: Mps One Binder
 MPL – MPL proto-oncogene
 mRNA - Messenger Ribonucleic Acid
 MST: Mammalian Sterile-like20 Family
 mTORC1 - mechanistic target of rapamycin complex 1
 n - Número de indivíduos
 NaCl - Cloreto de Sódio
 NF2 - Neurofibromina 2
 nm - Nanômetro
 nM - Nano Molar
 NMI - Neoplasia Mieloproliferativa Inclassificável

NMP – Neoplasias Mieloproliferativas
OMS - Organização Mundial da Saúde
PARP - Poly (ADP-ribose) polymerase
pb - Pares de Base
PBS - Phosphate Buffered Saline
PCR - Polymerase Chain Reaction
Ph – Philadelphia
PKB - Protein Kinase B
PI3-K - Phosphoinositide-3-Kinase
PIC - Protease Inhibitor Cocktail
Pqt – Plaquetas
pSTAT – STAT fosforilada
PV – Policitemia Vera
PVDF - Fluoreto de polivinilideno
qPCR - Quantitative Polymerase Chain Reaction
R - Reverse
RANTES - Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted
RIP - Receptor-interacting protein
RNA - Ribonucleic Acid
RDW - Red Cell Distribution Width
RPM - Rotações por minuto
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
SAV- Salvador
S - Serina
Ser- Serina
SBF – soro bovino fetal
SCF - Stem Cell Factor
SDS - Sodium Dodecyl Sulfate
SF3B1 - Splicing factor 3B subunit 1
SH2B3 - SH2B Adaptor Protein
SF3A1 - Splicing Factor 3a Subunit 1
shRNA - Short hairpin Interference Ribonucleic Acid
siRNA - Small Interference Ribonucleic Acid
SOX4 - SRY-related HMG-box 4

SP - São Paulo

SRSF2 - Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2

STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription

STAT3 - Signal Transducer and Activator of Transcription 3

STAT5 - Signal Transducer and Activator of Transcription 5

TAZ: Taffazin family

TBS-T - Tris Buffered Saline Tween 20

TEAD: Transcription factor family-TEAD1-4

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE – Trombocitemia Essencial

TET2 - Tet Methylcytosine Dioxygenase 2

TEF - Thyrotroph embryonic factor

Thr: Treonina

TLR - Toll Like Receptors

TNF - Tumor Necrosis Factor

TNF- α - Tumor Necrosis Factor -Alpha

TNFR1 - Tumor Necrosis Factor Receptor 1

Tpo – Trombopoetina

TPOR - Thrombopoietin Receptor

TRADD - TNFR1-associated death domain protein

TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand

Tris - Trisaminometano

Tris-HCL - (hydroxymethyl) aminomethane·hydrochloride

TyK2: Tyrosine Kinase 2

U2AF1 - U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

URE - Unidade Relativa de Expressão

USP - Universidade de São Paulo

V - Volts

VCM – Volume Corpuscular Médio

VP - Veteporfina

YAP: YES-associated protein family

ZRSR2 - Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif and Serine/Arginine Rich 2

μ F - MicroFarad

μ M - Micromolar

μL - Microlitro

μg - Micrograma

Lista de Símbolos

+ positivo

μ - mi

γ - gama

® - registrado

°C - graus Celsius

< - valor menor que

> - valor maior que

= igual

α - alfa

β - beta

γ - gama

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Lista de Símbolos	xvi
1.Introdução.....	1
1.1. Neoplasias Mieloproliferativas: Características gerais, epidemiologia e diagnóstico	2
1.2. Patogênese das neoplasias mieloproliferativas: Mutações JAK2, MPL e CALR	7
1.3. Neoplasias Mieloproliferativas e Inflamação	10
1.4.Via de sinalização Hippo	11
1.4.1.Via Hippo e a interação com as aurora quinases no ciclo celular.....	13
1.4.2.Via Hippo e apoptose	15
2. Objetivo	17
2.1. Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo proposto	18
3. Fluxograma dos Experimentos.....	19
4. Casuística	20
5. Material e Métodos.....	22
5.1. Colheita das amostras de sangue periférico e medula óssea	23
5.2. Determinação dos parâmetros hematológicos	23
5.3. Isolamento de leucócitos do sangue periférico dos pacientes e indivíduos controles ...	23

5.4. Obtenção de células precursoras hematopoéticas CD34 ⁺	24
5.5. Extração de RNA e síntese de cDNA	24
5.6. Quantificação dos genes por PCR em tempo real	25
5.7. Extração de DNA.....	27
5.8. Detecção da mutação CALR nas amostras JAK2V617F negativas	27
5.9. Quantificação das proteínas pela técnica de Western Blot	Erro! Indicador não definido.
5.10. Dosagem de citocinas e quimiocinas	29
6. Análise estatística	30
7. Resultados	32
7.1. Expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em pacientes com Policitemia Vera e correlação com os dados laboratoriais	33
7.2. Expressão dos genes <i>BAD</i> , <i>BAK</i> , <i>BCL-2</i> e <i>BCL-X_L</i> em pacientes com Policitemia Vera e correlação com a expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular.....	39
7.3. Expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em pacientes com Trombocitemia Essencial e correlação com parâmetros laboratoriais	43
7.4. Expressão dos genes pró e anti-apoptóticos <i>BAD</i> , <i>BAK</i> , <i>BCL-2</i> e <i>BCL-X_L</i> em pacientes com trombocitemia essencial e correlação com a expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular.....	52
7.5. Expressão dos genes da via Hippo e de ciclo celular em pacientes com Mielofibrose Primária e correlação com os parâmetros hematológicos.....	56
7.6. Expressão dos genes pró e anti apoptóticos <i>BAD</i> , <i>BAK</i> , <i>BCL-2</i> e <i>BCL-XL</i> em pacientes com mielofibrose primaria e sua correlação com a expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular	65
7.7. Comparação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular entre os grupos de pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primaria.....	69

7.8. Quantificação de citocinas e quimiocinas no plasma de pacientes com PV, TE e MF e indivíduos controles e correlação com dados laboratoriais	72
7.9. Comparação entre os níveis de citocinas/quimiocinas nos pacientes com TE e MF conforme <i>status</i> mutacional.....	75
7.10. Correlação entre os níveis plasmáticos das citocinas/quimiocinas analisadas nos grupos de pacientes.....	75
7.11. Comparação do perfil inflamatório entre os pacientes com NMP e controles	77
7.12. Correlações entre os níveis de citocinas/quimiocinas e os parâmetros hematológicos dos pacientes com NMP	79
7.13. Correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e a expressão de genes da via Hippo em pacientes com NMP.....	82
 8. Discussão.....	 88
 9. Conclusão	 98
 10. Referências Bibliográficas	 101
 11. Apêndices	 117
 12. Anexos.....	 126

1. Introdução

1.1. Neoplasias Mieloproliferativas: Características gerais, epidemiologia e diagnóstico

As neoplasias mieloproliferativas (NMP), descritas como desordens hematológicas que afetam a célula tronco hematopoética, foram classificadas inicialmente por William Dameshek em 1951, com base na observação da proliferação, morfologia celular e similaridades clínicas (DAMESHEK, 1951).

As NMP são doenças hematológicas que compartilham características fisiopatológicas, como o envolvimento do progenitor hematopoético multipotente, proliferação de um ou mais elementos mieloides no sangue na ausência de estímulos, hiper celularidade da medula óssea, hematopoese extramedular, e potencial progressão para leucemia aguda ou mielofibrose secundária (MESA et al., 2007; SPIVAK et al., 2003).

Uma característica marcante das NMP é a resposta anormal e exacerbada das células hematopoéticas às citocinas e fatores de crescimento como eritropoetina (Epo), Fator estimulante de colônia granulocítica-macrofágica (GM-CSF - do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), Interleucina 3 (IL-3), Fator de célula tronco (SCF - do inglês *Stem Cell Factor*) e Fator de crescimento tipo Insulina 1 (IGF-1 - do inglês *Insulin-like growth factor 1*) (DAI et al., 1994; MIRZA; EZZAT; AXELRAD, 1997).

Conforme a classificação da organização mundial da saúde (OMS) de 2016, se enquadram nessa categoria a leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera (PV), mielofibrose primária (MF), trombocitemia essencial (TE), leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica não especificada (LEC), mastocitose (M) e neoplasia mieloproliferativa inclassificável (NMI) (SWERDLOW et al., 2016). O alvo deste estudo inclui investigação da fisiopatologia da policitemia vera, mielofibrose primária e trombocitemia essencial.

A policitemia vera é caracterizada por expansão clonal exacerbada do progenitor eritróide hematopoético, eritrocitose e algumas vezes por leucocitose e/ou trombocitose (STEIN; MOLITERNO; TIU, 2014). De acordo com a revisão de 2016 dos critérios de diagnóstico estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para as NMP, o paciente precisa preencher três critérios maiores ou dois critérios maiores e um critério menor para se enquadrar nessa entidade clínica (SWERDLOW et al., 2016). Os critérios de diagnóstico para PV estabelecidos pela OMS estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Critérios de diagnóstico para Policitemia Vera de acordo com a Classificação da Organização Mundial da Saúde – 2016.

<i>Critérios de diagnóstico para PV</i>	
<u>Critérios maiores:</u>	
1- Hemoglobina > 16,5 g/dL em homens ou > 16,0 g/dL em mulheres	
OU	
Hematócrito > 49% em homens ou > 48% em mulheres	
OU	
Aumento da massa de glóbulos vermelhos (25% a mais que o valor de referência)	
2- Biópsia da Medula óssea mostrando hiperplasia panmielocítica para a idade	
3- Presença da mutação JAK2V617F ou JAK2 éxon 12	
<u>Critério menor:</u>	
Níveis subnormais de eritropoetina no soro	

A PV acomete mais mulheres do que homens (SPIVAK et al., 2014) e é incomum em pacientes com menos de 60 anos (SPIVAK, 2017). A incidência de PV é de 0,68 - 2,6 para cada 100.000 indivíduos por ano (MOULARD et al., 2014). Pacientes com PV tem expectativa de vida de 14 anos após o diagnóstico (TEFFERI et al., 2014b) e de acordo com a estratificação de riscos podem ser divididos em duas categorias: alto risco (idade superior a 60 anos ou história de trombose) e baixo risco (ausência de ambos os fatores de risco) (CAROBBIO et al., 2011; FINAZZI; BARBUI, 2008).

A trombocitemia essencial caracteriza-se pelo aumento de células da linhagem megacariocítica, presença de megacariócitos maduros, eritropoese e granulopoeese normais, sem qualquer evidência de leucemia mieloide crônica, síndrome mielodisplásica ou trombocitose reativa. Além disso, pacientes com TE positivos para JAK2V617F tem menores níveis de eritropoetina e ferritina no soro do que aqueles sem a mutação, sugerindo que sua capacidade de gerar eritrócitos pode estar comprometida (HARRISON, 2010). Os critérios de diagnóstico estabelecidos pela OMS para TE estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Critérios de diagnóstico para Trombocitemia Essencial de acordo com a Classificação da Organização Mundial da Saúde – 2016.

<i>Critérios de diagnóstico para TE</i>
<u>Critérios maiores:</u>
1- Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$
2- Biópsia da medula óssea mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariocítica com aumento de megacariócitos maduros com núcleos hiperlobulados. Sem aumento significativo ou desvio à esquerda de neutrófilos e aumento muito raro (grau 1) nas fibras de reticulina.
3- Não preencher critérios de diagnóstico da OMS para LMC <i>BCR-ABL1</i> , PV, MF, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mieloides.
4- Presença de mutação JAK2V617F, CALR ou MPL.
<u>Critério menor:</u>
Presença de um marcador clonal ou ausência de evidência de trombocitose reativa

Assim como na PV, o gênero feminino é o mais acometido pela TE e a doença é incomum em pacientes com menos de 60 anos (SPIVAK, 2017; SPIVAK et al., 2014). A incidência estimada de TE é de 0,38 - 1,7 para cada 100.000 indivíduos por ano e a sobrevida estimada é de 20 anos após o diagnóstico. A estratificação de risco inclui quatro categorias: risco muito baixo (idade ≤ 60 anos, sem histórico de trombose, JAK2/MPL normais), baixo risco (idade ≤ 60 anos, sem histórico de trombose, JAK2/MPL mutado), risco intermediário (idade > 60 anos, sem histórico de trombose, JAK2/MPL normais) e alto risco (história de trombose ou idade > 60 anos com mutação JAK2/MPL) (TEFFERI; BARBUI, 2017).

Apesar de não fazer parte dos critérios de estratificação de risco, os pacientes com TE que apresentam a mutação CALR possuem o curso da doença mais indolente, melhor prognóstico e aumento da sobrevida em comparação aos pacientes com a mutação JAK2V617F (KLAMPFL et al., 2013a; TEFFERI et al., 2014a, p. 2, 2014b).

A mielofibrose primária é caracterizada por aumento da proliferação de granulócitos e megacariócitos, podendo apresentar ou não aumento de deposição de reticulina na medula óssea. A taxa de incidência da MF varia de 0,1 – 1.0 para cada 100.000 indivíduos por ano (MOULARD et al., 2014). A idade média ao diagnóstico é de 66 anos e a doença ocorre na mesma proporção em ambos os gêneros (CAMPO et al., 2011; MITRA et al., 2013). A morbidade e a mortalidade associadas à MF estão relacionadas à ocorrência de infecções, hemorragias, hipertensão portal, falência cardíaca, trombose, complicações pós-esplenectomia e evolução para leucemia aguda (ARANA-YI et al., 2006). Os critérios de diagnóstico estabelecidos pela OMS para a MF estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Critérios de diagnóstico para Mielofibrose Primária de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde – 2016.

Critérios de diagnóstico para MF
<u>Critérios maiores:</u>
1- Proliferação megacariocítica com atipia, sem fibrose de reticulina grau 1, acompanhada de maior celularidade da medula óssea ajustada pela idade, proliferação granulocítica e, muitas vezes, diminuição da eritropoese.
2- Não preencher critérios de diagnóstico da OMS para LMC <i>BCR-ABL1</i> , PV, síndromes mielodisplásicas, ou outras neoplasias mieloides
3- Presença de mutação <i>JAK2V617F</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> ou na ausência dessas mutações, presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reativa de reticulina na medula óssea
<u>Critérios menores:</u>
Presença de pelo menos uma das seguintes alterações, confirmada em duas determinações consecutivas:
a) anemia não atribuída a uma condição comórbida
b) Leucócitose $\geq 11 \times 10^9/L$
c) esplenomegalia palpável
d) aumento de LDH

O prognóstico dos pacientes com MF é o pior dentre as NMP. Os parâmetros clínico-laboratoriais utilizados para definir o escore prognóstico para MF teve início com o desenvolvimento do Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica (IPSS - do inglês *International Prognostic Scoring System*) em 2009. O IPSS para MF é aplicável aos pacientes avaliados no momento do diagnóstico inicial e usa cinco preditores independentes de sobrevida inferior: idade > 65 anos, hemoglobina <10 g/dL, contagem de leucócitos $>25 \times 10^9/L$, blastos circulantes $\geq 1\%$ e a presença de sintomas constitucionais (ex: febre e perda de peso). A presença de 0, 1, 2 e ≥ 3 fatores adversos define o risco como baixo, intermediário-1, intermediário-2 e de alto risco, respectivamente. As médias de tempo de sobrevida correspondem, respectivamente, a 11,3; 7,9; 4 e 2,3 anos (TEFFERI, 2016). Subsequentemente, foram criados outros sistemas de pontuação prognóstica chamados DIPSS e o DIPSS-Plus (do inglês *Dynamic International Prognostic Scoring System Plus*). Esses índices de prognóstico podem ser aplicados a qualquer momento durante o curso da doença e, além das variáveis já descritas, incluem a contagem de plaquetas $< 100 \times 10^9/L$, a necessidade de transfusão de células vermelhas e cariótipo desfavorável (cariótipo complexo com uma ou duas anormalidades que incluem +8, -7/7q-, i (17q), inv (3), -5/5q-, 12p ou 11q23).

As quatro categorias de risco DIPSS-Plus com base nos oito fatores de risco acima mencionados são: baixa (sem fatores de risco), intermediário-1 (um fator de risco), intermediário-2 (dois ou 3 fatores de risco) e alta (quatro ou mais fatores de risco) com os

respectivos tempos de sobrevida de 15,4; 6,5; 2,9 e 1,3 anos (TEFFERI, 2016). Assim como na TE, os pacientes com MF com a mutação CALR apresentam melhor prognóstico e aumento da sobrevida em comparação aos pacientes com a mutação JAK2V617F (KLAMPFL et al., 2013a; TEFFERI et al., 2014a, p. 2, 2014b).

O tempo de sobrevida dos pacientes com PV e TE é relativamente alto e o risco de transformação leucêmica é baixo, portanto o objetivo primordial do tratamento nesses pacientes é prevenir trombozes e aliviar os sintomas.

As opções de tratamento disponíveis incluem a droga de primeira linha conhecida como hidroxycarbamida (Hidroxiuréia, HU) que atua como agente citorredutor pela inativação da síntese de DNA (YARBRO, 1992). Entretanto, aproximadamente 24% dos pacientes desenvolvem resistência ou intolerância à HU ao longo do tempo (ALVAREZ-LARRÁN et al., 2009) e, mais importante ainda, a resistência à HU está associada a um curso mais agressivo da doença em pacientes com PV, sendo que esses pacientes apresentam aumento de 5,6 vezes no risco de morte e aumento de 6,8 vezes no risco de transformação para a mielofibrose secundária ou leucemia mieloide aguda (LMA) (ALVAREZ-LARRÁN et al., 2009).

Nos casos de toxicidade à HU ou falência terapêutica, opta-se pela administração de interferon-alfa (IFN- α) ou busulfano. O IFN- α é uma citocina que apresenta atividade antiproliferativa em células tronco hematopoéticas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo capaz de induzir e manter a remissão hematológica completa em pacientes com PV (MASSARO et al., 1997). O tratamento com IFN- α em pacientes com TE tem se mostrado eficaz, sendo associado a remissões clínicas (70 – 80%) e moleculares (10 – 20%) em alguns pacientes, especialmente naqueles com a mutação CALR. A toxicidade tem sido uma barreira significativa para o uso do IFN- α , pois aproximadamente 25% - 40% dos pacientes descontinuem a terapia devido aos efeitos colaterais que incluem fadiga, depressão, dor musculoesquelética, mudanças no humor, ansiedade, reação no local da injeção e toxicidade gastrointestinal, incluindo náuseas, vômitos, diarreia e perda de peso (NAZHA; GERDS, 2016).

O Busulfano é um agente de alquilação e tem sido usado como tratamento para várias doenças hematológicas malignas. Em pacientes com PV e TE, o busulfano, usado em menor dose (2 - 4 mg/dia), pode resultar em controle hematológico razoável mas não altera a história natural dessas NMP (CHESON; RUMMEL, 2009; SHVIDEL et al., 2007).

Recentemente, inibidores das Janus quinases 1 e 2 foram desenvolvidos para o tratamento das NMP. Dentre estes, a droga ruxolitinibe teve seu uso clínico aprovado para o

tratamento da MF de risco intermediário-2 e alto risco, sendo o primeiro inibidor oral de JAK1/2 aprovado para o tratamento de pacientes com PV resistentes ou intolerantes à HU.

Estudos recentes de Fase II e III demonstram sua eficácia no controle dos sintomas e parâmetros da doença, como porcentagem do hematócrito ou tamanho do baço nos pacientes com PV (VERSTOVSEK et al., 2014, p. 2), além disso, o ruxolitinibe diminui a esplenomegalia (redução maior que 50% de palpação) em 44% dos pacientes com MF, tanto JAK2V617F positivos, quanto negativos (BLUM; MARTINS; ALBERIO, 2016). O ruxolitinibe age ao competir com a ligação da adenosina trifosfato (ATP) no sítio catalítico da JAK2, inibindo a sua atividade quinase. Os eventos adversos mais frequentes consistem em toxicidade gastrointestinal e imunossupressão, que inclui elevado risco de infecção e reativação de vírus herpes e outros agentes infecciosos controlados através da imunidade celular. (BLUM; MARTINS; ALBERIO, 2016). A única opção curativa para os pacientes com NMP é o transplante de medula óssea que é indicado principalmente aos pacientes com MF, porém poucos são os pacientes elegíveis devido à idade avançada e a presença de outras comorbidades (YARBRO, 1992).

1.2. Patogênese das neoplasias mieloproliferativas: Mutações JAK2, MPL e CALR

O marco inicial dos achados fisiopatológicos das NMP relacionados às alterações moleculares ocorreu em 2005, quando o grupo de pesquisa liderado pelo doutor William Vainchenker identificou a mutação JAK2V617F (JAMES et al., 2005), presente em cerca de 95% dos pacientes com policitemia vera e aproximadamente 50% dos pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose primária (LEVINE et al., 2005; STEENSMA et al., 2005).

A mutação no gene *Janus kinase 2* (JAK2) afeta a atividade quinase da proteína citoplasmática JAK2, enzima responsável por mediar a sinalização intracelular de citocinas e fatores de crescimento. A mutação JAK2V617F é consequência da transversão de uma guanina por uma timidina na posição 1849 no éxon 14, resultando na substituição do aminoácido valina por uma fenilalanina no códon 617. Essa alteração promove a ativação constitutiva da via de sinalização JAK-STAT, favorecendo a proliferação dos precursores hematopoéticos mieloides (DENYS et al., 2010; HUIJSMANS et al., 2011; VANNUCCHI et al., 2008a).

A mutação JAK2V617F pode ser detectada em pacientes na forma heterozigótica ou pode progredir para a forma homozigótica por recombinações mitóticas. A carga alélica da

mutação JAK2V617F pode estar relacionada à progressão da PV e da TE para a MF (DENYS et al., 2010; STEENSMA, 2006). Em contrapartida, a baixa carga alélica tem sido relacionada à menor sobrevida em pacientes com MF quando comparado aos pacientes com TE e PV (STEENSMA, 2006).

Cerca de 95% dos pacientes com PV possuem a mutação JAK2V617F (LEVINE et al., 2006, p.). No entanto, os 5% dos pacientes negativos para a mutação fez com que Scott e colaboradores formassem a hipótese de que a sinalização JAK-STAT seria ativada por novas mutações neste grupo de pacientes, o que levou à identificação de mutações somáticas no éxon 12 da *JAK2* nos pacientes PV negativos para a mutação *JAK2* do éxon 14 (SCOTT et al., 2007).

Pelo menos oito mutações somáticas diferentes que variam entre deleções ou inserções no éxon 12 da *JAK2* foram identificadas em pacientes PV negativos para JAK2V617F, mas não em pacientes com TE ou MF (KILADJIAN et al., 2008; PIETRA et al., 2008; WILLIAMS et al., 2007).

A maioria dos pacientes com mutações no éxon 12 do *JAK2* exibe fenótipo clínico específico, com policitemia, leucocitose variável, mas não trombocitose. Isto sugere que mutações diferentes no mesmo gene podem gerar efeitos diferentes na sinalização JAK-STAT, o que resulta em fenótipos clínicos distintos (KILPIVAARA; LEVINE, 2008).

Na PV, as mutações JAK2V617F e *JAK2* éxon 12 estão presentes em praticamente todos os pacientes, entretanto, metade dos pacientes com TE e MF são negativos para tais mutações. Considerando a possibilidade das alterações na via de sinalização JAK-STAT estar relacionada à fisiopatologia das NMP mesmo nos pacientes sem a mutação no gene *JAK2*, Pikman e colaboradores em 2006 questionaram se outras mutações nos receptores de citocinas do tipo I, que interagem com JAK2, poderiam participar do desenvolvimento dessas doenças e identificaram mutações no gene que codifica o receptor de trombopoetina (MPL) (PIKMAN et al., 2006a).

A mutação no gene *MPL* ocorre pela substituição do triptofano no códon 515 por uma arginina ou leucina ou lisina ou alanina (PARDANANI et al., 2006; PIKMAN et al., 2006a). Esta mutação ocorre em cerca de 8,5% dos pacientes com TE JAK2V617F negativos e em aproximadamente 10% dos pacientes com MF JAK2V617F negativos (PARDANANI et al., 2006; PIKMAN et al., 2006a). O receptor MPL está pré-associado com as enzimas quinases JAK2 e TYK2 no retículo endoplasmático. Essas duas quinases desempenham papel de chaperonas e aumentam o transporte do receptor MPL para a membrana celular. O complexo MPL/JAK2 torna-se maduro durante o transporte no aparelho de Golgi, onde o MPL sofre

sucessivas glicosilações nos resíduos de asparagina (N-glicosilações) e é exposto à superfície celular como receptor parcialmente pré-dimerizado. O triptofano na posição 515 é responsável por prevenir a dimerização do MPL na ausência de citocinas, entretanto, a sua substituição por leucina ou lisina ou arginina ou alanina permite que essa dimerização ocorra, levando à ativação constitutiva do receptor e da via JAK-STAT, com consequente proliferação exacerbada das células mieloides (PIKMAN et al., 2006b; PLO et al., 2017).

Os pacientes com TE com a mutação MPLW515 apresentam maior contagem de plaquetas e níveis mais baixos de hemoglobina do que os pacientes com TE com a mutação JAK2V617F (BEER et al., 2008; VANNUCCHI et al., 2008b). Pacientes com MF com a mutação MPLW515 apresentam anemia mais grave em comparação àqueles com a mutação JAK2V617F (GUGLIELMELLI et al., 2007). Esses dados sugerem que há diferenças na sinalização entre as mutações JAK2V617F e MPLW515, que são de relevância clínica (KILPIVAARA; LEVINE, 2008).

Em 2013, mutações *indel* no éxon 9 do gene *CALR* foram detectadas em cerca de 30% dos pacientes com TE e MF negativos para a mutação JAK2V617F e o curso clínico desses pacientes foi considerado mais indolente do que em pacientes com a mutação JAK2V617F (KLAMPFL et al., 2013b; NANGALIA et al., 2013).

Cerca de 36 tipos de mutações no gene *CALR* foram descritas, porém, as mais frequentes são as do tipo 1, que corresponde à deleção de 52 pares de base (pb) e representa 53% dos casos e do tipo 2, que corresponde à inserção de 5 pb e representa 31,7% dos casos. Ambas as mutações resultam em alterações no sentido de leitura do gene, com consequente substituição da região C-terminal, codificada pelo éxon 9 (KLAMPFL et al., 2013b).

O gene *CALR* codifica a proteína de nome calreticulina (CALR) presente no retículo endoplasmático com função chaperona no enovelamento de glicoproteínas, além de ser importante na ligação com íons cálcio (CHI et al., 2014). Esta proteína é composta por três domínios estruturais e funcionalmente distintos. O domínio correspondente à região C-terminal contém nucleotídeos responsáveis pela retenção da proteína ao retículo endoplasmático, entretanto, mutações no gene *CALR* levam à substituição desta região C-terminal negativamente carregada por uma região positivamente carregada, rica em arginina e metionina, permitindo que a calreticulina se transloque para a membrana celular onde irá interagir com o receptor MPL (CAZZOLA; KRALOVICS, 2014; RUMI et al., 2014).

A proteína CALR mutada ativa de forma constitutiva o receptor de MPL, mesmo na ausência de TPO e induz a transformação celular, provavelmente desempenhando papel na sinalização MPL-JAK2. A interação preferencial entre o mutante CALR e MPL ocorre por

mudança conformacional que parece ser induzida pelo domínio C-terminal mutante, permitindo a ligação do domínio N-terminal ao MPL (ARAKI; KOMATSU, 2017). A mutação no gene *CALR* induz a ativação da via JAK2/STAT/fosfatidilinositol-3'-quinase (PI3-K) e proteína ativada por mitogênio (MAP) via MPL, acarretando na proliferação exacerbada de células mieloides (CHACHOUA et al., 2016).

Apesar dos numerosos conhecimentos descritos sobre a fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas e da descoberta de importantes mutações como JAK2V617F, MPL e *CALR*, a etiologia das NMP ainda é desconhecida e a elucidação de outras alterações genéticas e/ou celulares são necessárias para terapias mais eficientes.

Nesse sentido, o presente trabalho contribui com a descrição das alterações na via de sinalização Hippo e sua correlação com o processo inflamatório e de morte celular em NMP.

1.3. Neoplasias Mieloproliferativas e Inflamação

As NMP são consideradas doenças “oncoinflamatórias”, caracterizando-se pela atividade anormal do sistema imune, aumento do compartimento de monócitos/macrófagos, expansão de células mieloides supressoras, frequência anormal de células T reguladoras e disfunção de células *natural killer* e células T CD4⁺ (BAROSI, 2014).

A inflamação crônica ocorre de maneira precoce em muitos tipos de câncer e em certos linfomas, mas nas NMP, existe a possibilidade de que a inflamação crônica preceda a aquisição das principais mutações; porém, independente de sua cronologia, o processo inflamatório facilita ainda mais a alteração do DNA nas células neoplásicas (HERMOUET; BIGOT-CORBEL; GARDIE, 2015).

O perfil plasmático de citocinas/quimiocinas nos pacientes com TE, MF e PV encontra-se desregulado, o que culmina na manutenção de um estado pró-inflamatório nessas doenças, que é ainda mais evidente na MF (BAROSI, 2014; CACEMIRO et al., 2018).

Nas NMP, a resposta imune dos pacientes inclui a mobilização e atividade efetora de células mieloides mutadas (clonais) e saudáveis. Dessa forma, dependendo da quantidade de clones malignos, as respostas imune e inflamatória podem ser parcial ou totalmente clonais, comprometendo o seu controle e efetividade sendo, portanto, importantes na patogênese e prognóstico das NMP (HERMOUET; BIGOT-CORBEL; GARDIE, 2015).

Pelo exposto, o melhor entendimento do processo inflamatório nessas doenças e a descrição da etiologia oferecem novas perspectivas de tratamento (HERMOUET; BIGOT-CORBEL; GARDIE, 2015).

1.4.Via de sinalização Hippo

A via de sinalização Hippo é definida como uma via supressora de tumor responsável por regular a proliferação, diferenciação e morte celular. Foi primeiramente descrita em *Drosophila Melanogaster* como via responsável pelo controle do crescimento de órgãos e é altamente conservada em mamíferos (WU et al., 2003).

Essa via de sinalização é composta por três partes interligadas: os componentes regulatórios, os componentes da cascata de sinalização, incluindo proteínas quinase e adaptadoras, e finalmente, a maquinaria de transcrição (HONG; GUAN, 2012).

A cascata de sinalização é composta pelas proteínas MST1/MST2, SAV1, LATS1/LATS2, MOBKL1A/MOBKL1B, YAP e TAZ e a ativação clássica da via se inicia com a fosforilação de MST1/MST2 e de sua proteína adaptadora SAV1 por diferentes sinais reguladores. As proteínas MST1/2 quando ativadas, fosforilam e ativam LATS1 e LATS2 em um processo que requer interação com pequenas proteínas MOBKL1A, MOBKL1B, MOBKL2A e MOBKL2B, as quais também sofrem fosforilação por MST1/2. As proteínas LATS1/2 ativadas podem então fosforilar diferentes resíduos de serina/treonina dos fatores transcricionais YAP e TAZ. Quando YAP é fosforilado nas serinas 127 ou 381 e TAZ é fosforilado nas serinas 89 ou S311, eles se ligam ao complexo de proteínas 14.3.3 no citoplasma, o que inibe a sua atividade transcricional e promove a retenção e degradação citosólica de YAP/TAZ (COUZENS et al., 2013; HONG; GUAN, 2012; SANSORES-GARCIA et al., 2013).

Quando a via está desligada não ocorre a fosforilação de YAP/TAZ, permitindo que ambos se transloquem para o núcleo da célula, onde se associam a fatores de transcrição membros da família TEAD1-4 (TEAD/TEF) (Figura 1). A interação de YAP/TAZ com TEAD/TEF parece mediar funções oncogênicas e proliferativas desses genes por induzir a expressão de genes alvo como o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF - do inglês *connective tissue growth factor*), indutor angiogênico rico em cisteína 61 (CYR61 - do inglês *cysteine-rich angiogenic inducer 61*) e fator de crescimento de fibroblastos 1 (FGF1 - do inglês *fibroblast growth factor 1*), envolvidos no processo de proliferação celular e inibição da apoptose (ZHAO et al., 2008).

Como YAP/TAZ são co-ativadores transcricionais de genes envolvidos na divisão celular, a desregulação da via Hippo leva à proliferação celular descontrolada, presente em neoplasias (PLOUFFE; HONG; GUAN, 2015).

Figura 1 - Cascata de sinalização da via Hippo em mamíferos. A via de sinalização ativada culmina na fosforilação de YAP/TAZ, que serão retidos no citoplasma após interação com o complexo de proteínas 14.3.3 e degradados. Quando a via está desligada, YAP/TAZ não são fosforilados e se translocam para o núcleo da célula, onde se ligam aos fatores de transcrição da família TEAD1-4, promovendo transcrição de genes envolvidos na regulação da proliferação celular e resistência à morte. Adaptado de Cacemiro et al, 2017 (CACEMIRO et al., 2017).

MST1 e MST2 são proteínas codificadas por genes localizados nos cromossomos 20 (20q11.2-q13.2) e 8 (8q22.2), respectivamente (LI et al., 2016b). A falta de inibição de YAP tem sido associada à perda de função dos genes *MST1/MST2* nos casos de carcinoma hepatocelular (ZHOU et al., 2009, p. 1).

O gene supressor de tumor *LATS* codifica duas quinase pertencentes à família AGC. Assim sendo, os genes: 1) *LATS1*, localizado no cromossomo 6 (6q25.1), traduz a proteína LATS1, que atua durante a mitose, interagindo com a proteína LIM localizada no aparelho mitótico; sugerindo seu papel na regulação da progressão mitótica; 2) *LATS2*, localizado no cromossomo 13 (13q12.11) e que codifica a proteína LATS2, age na regulação do ciclo celular induzindo a parada do ciclo celular na fase G2/M (BASU; REYES-MÚGICA; REBBAA, 2013).

A baixa expressão do RNA mensageiro (mRNA) de *LATS1* e *LATS2* foi associada ao tamanho do tumor em câncer de mama e metástase para linfonodos e ao pior prognóstico e progressão de glioma (JI et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2005).

Os genes *MOB1A* (*MOBK1A*) e *MOB1B* (*MOBK1B*) estão localizados nos cromossomos 2 (2p13.1) e 4 (4q13.3), respectivamente, e codificam proteínas de mesmo nome, as quais desempenham papéis importantes na duplicação de centríolo (TANG et al., 2014). Em estudos de fisiopatologia dos cânceres colorretal e de pulmão foram observados baixos níveis da expressão de *MOB1A* (KOSAKA et al., 2007; SASAKI et al., 2007).

YAP1 é codificado pelo gene *YAP1* localizado no cromossomo 11 (11q13) (WEI et al., 2013) e sua desregulação contribui para a progressão do câncer de ovário e a oncogênese do carcinoma de células escamosas esofágica (HALL et al., 2010; MURAMATSU et al., 2011). Entretanto, outros estudos publicados mostram que o *YAP1* possui papel anti-tumoral ao induzir apoptose e prevenir metástases em câncer de mama, pescoço e de cabeça (BASU et al., 2003; EHSANIAN et al., 2010; YUAN et al., 2008).

A proteína TAZ, codificada pelo gene *TAZ* localizado no cromossomo X (Xq28), está associada à tumorigênese no carcinoma de células escamosas da língua, crescimento do tumor de células da mama e crescimento das células da tireóide no carcinoma papilar da tireóide quando sua expressão está elevada (DE CRISTOFARO et al., 2011a; WEI et al., 2013; ZHAO et al., 2012).

Nos tumores sólidos, YAP/TAZ parecem atuar como oncogenes e em neoplasias hematopoéticas seu papel depende do contexto celular.

No mieloma múltiplo (MM) e nas leucemias (leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia mieloide aguda e leucemia linfoblástica aguda de células T), o YAP exerce função supressora do tumor regulando a resposta ao dano dependente do ABL1 e induzindo apoptose nas células tumorais, assim sendo a regulação negativa de YAP/TAZ é frequentemente observada em MM e leucemias (COTTINI et al., 2014).

De modo geral, a via Hippo regula os mecanismos celulares de proliferação e morte, nos quais pode desempenhar papel pró ou anti tumoral. Nesse sentido, a via Hippo pode ser considerada importante alvo terapêutico em diversas doenças humanas, incluindo as neoplasias hematológicas.

1.4.1. Via Hippo e a interação com as aurora quinases no ciclo celular

O gene *AURKA* localiza-se no cromossomo 20 (20q13.2) e o gene *AURKB* no cromossomo 17 (17p13.1). Ambos os genes codificam proteínas quinases de mesmo nome que estão envolvidas no controle da mitose (GOLDENSON; CRISPINO, 2015).

A principal função da AURKA é coordenar a maturação do centrôssoma, a montagem do fuso bipolar e a separação dos cromossomos (KAESTNER; STOLZ; BASTIANS, 2009). Portanto, sua expressão, localização e atividade são consistentes com a sua função de quinase centrôssomal. Os níveis de AURKA são baixos durante a fase G1/S, mas aumentam em G2, com função e pico de expressão na fase M inicial (ZHOU et al., 1998). Com relação à localização, ela é encontrada no centrôssoma em células mitóticas do final da fase S e G2 até a telófase, mas também se localiza no fuso ao longo do processo mitótico (KAESTNER; STOLZ; BASTIANS, 2009; ZHOU et al., 1998).

As contribuições da AURKA para a oncogênese podem ocorrer por meio de defeitos no processo de segregação dos cromossomos. A expressão anormal da AURKA promove a aneuploidia e instabilidade genética, como por exemplo, a amplificação do centrôssoma causada pela superexpressão de AURKA que induz fusos multipolares. O mau funcionamento da AURKA também pode causar defeitos na separação dos centrôssomas, desencadeando a formação de um fuso monopolar, levando à mitose abortiva e à formação de células tetraplóides (KE et al., 2003; VERNOS; KARSENTI, 1995).

A AURKB desempenha três funções diferentes durante o ciclo celular: 1) fosforila proteínas da cromatina, como a histona H3, auxiliando na condensação mitótica dos cromossomos; 2) contribui para o ponto de checagem (*checkpoint*) do fuso por meio da fosforilação da cinesina associada ao centrômero mitótico de depolimerase de microtúbulos (MCAK- do inglês *microtubule depolymerase mitotic centromere-associated kinesin*), onde ela atua corrigindo qualquer conexão incorreta do cinetócoro ao fuso (ANDREWS et al., 2004; LAN et al., 2004) e 3) atua na citocinese, uma vez que na sua ausência, as duas células-filhas permanecem ligadas pelas pontes de citoplasma (TERADA, 2001).

A AURKB apresenta expressão elevada em muitos tumores primários, resultando em multinucleação e poliploidia de células humanas (BISCHOFF et al., 1998; NGUYEN et al., 2009).

Na leucemia mieloide aguda, por exemplo, observou-se superexpressão de ambos AURKA e AURKB nos blastos dos pacientes em comparação com as células CD34⁺ do grupo controle, além disso, essa superexpressão está associada a anormalidades citogenéticas desfavoráveis e a outros fatores adversos, como a contagem elevada de leucócitos (YANG et al., 2013, p. 34; YE et al., 2009, p. 34).

Ambas as proteínas aurora quinases e LATS participam da regulação do ciclo celular. Foi recentemente demonstrado que as quinases LATS1/2 fosforilam diretamente a proteína interna do centrômero (INCENP - do inglês *inner centromere protein*) na serina S894 durante

a mitose, a INCENP fosforilada, por sua vez, ativa a AURKB, processo necessário para completar a divisão celular multipolar em resposta ao dano do microtúbulo (YABUTA et al., 2016).

Além disso, LATS2 interage temporariamente com a AURKA, e ambos se co-localizam nos centrossomas durante o ciclo celular. Ademais, a inibição da fosforilação induzida por AURKA na serina S83 de LATS2 perturba parcialmente sua localização centrosomal impedindo que ele exerça sua função (TOJI et al., 2004).

Há relatos de que a interação das auroras quinases e LATS2 seria a garantia da localização mitótica adequada de LATS2, portanto, o eixo AURKA-LATS1/2-AURKB pode ser considerado um novo meio de regulação da progressão mitótica (YABUTA et al., 2011).

1.4.2. Via Hippo e apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre fisiologicamente no embrião em desenvolvimento e em tecidos adultos saudáveis e sua alteração está associada ao aparecimento e progressão de diferentes doenças, como por exemplo os tumores (ALISON; SARRAF, 1992).

A regulação da apoptose ocorre principalmente por meio das vias de sinalização extrínseca ou de receptor da morte e a via intrínseca ou mitocondrial. Ambas convergem na via de execução, mediada intracelularmente pela ativação da cascata de proteases de cisteína, denominadas caspases (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008; VOUSDEN; LU, 2002).

A via de sinalização extrínseca ativa-se por interações de receptores transmembranares conhecidos como receptores de morte que são membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001). A sequência de eventos que define a via extrínseca da apoptose tem como modelos a interação das moléculas FasL/FasR e TNF- α /TNFR1. Nestes modelos, existe a clusterização de receptores e ligação com o seu ligante trimérico, levando ao recrutamento de proteínas adaptadoras citoplásmicas que exibem correspondentes domínios de morte que se ligam aos receptores. A ligação do Fas ao receptor FasL resulta na ligação da proteína adaptadora FADD, e a ligação do TNF ao seu receptor TNFR1, resulta na ligação da proteína adaptadora TRADD e no recrutamento de FADD e RIP. O FADD associa-se então à procaspase-8 por meio da dimerização do domínio efetor de morte, formando um complexo sinalizador indutor de morte (DISC - do inglês *Death-inducing signaling complex*) que resulta na ativação auto catalítica da procaspase-8 (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; KISCHKEL et al., 1995; WAJANT, 2002).

A ativação da via de sinalização intrínseca é desencadeada por um conjunto diversificado de estímulos induzindo sinais intracelulares que atuam diretamente na mitocôndria. Os estímulos negativos envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormônios e citocinas que podem levar à falha na supressão dos programas de morte, desencadeando a apoptose, enquanto que estímulos positivos à apoptose incluem, mas não são limitados a: radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres. Todos os estímulos causam alterações na membrana mitocondrial interna, promovendo a abertura do poro mitocondrial e aumento da permeabilidade e perda do potencial transmembrana mitocondrial (ELMORE, 2007; SAELENS et al., 2004).

O controle e a regulação dos eventos mitocondriais apoptóticos ocorrem através de membros da família de proteínas Bcl-2. Fazem parte da família Bcl-2 os membros anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-x, Bcl-x_L, Bcl-x_S, Bcl-w, BAG e os pró-apoptóticos Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk. Essas proteínas controlam e determinam se a célula entra em apoptose ou permanece viva (CORY; ADAMS, 2002; ELMORE, 2007).

Há poucos relatos na literatura sobre a interação da via Hippo e a apoptose. A via Hippo parece participar da regulação da apoptose por meio da interação entre as proteínas YAP/TAZ e os fatores de transcrição da família TEAD. Essa interação promove a transcrição de genes que inibem a apoptose como *CTGF*, *MYC*, *SOX4*, *MCL1*, survivina/*BIRC5* e *BIRC2* (DONG et al., 2007; LEE et al., 2018).

Além disso, foi descrito que a proteína estimuladora da apoptose p53 1 (ASPP1 - do inglês *Apoptotic specific regulator of p53 1*) é capaz de inibir a interação entre YAP e LATS1, aumentando o acúmulo nuclear de YAP/TAZ e dos reguladores transcricionais dependente de YAP/TAZ (VIGNERON; LUDWIG; VOUSDEN, 2010). Ao mesmo tempo, usando as linhagens celulares epiteliais MCF10A, AML12, RPE e 293T, foi demonstrado que YAP/TAZ inibem os genes supressores de tumor, incluindo o transcrito induzido por dano ao DNA 4 (*DDIT4* - do inglês *DNA-damage-inducible transcript 4*) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (*TRAIL* - do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), que são inibidores do alvo mecanístico da rapamicina 1 (mTORC1 - do inglês *mechanistic target of rapamycin 1*), com consequente inibição da apoptose (KIM et al., 2015).

Nesse cenário, o presente trabalho investigou a potencial associação do processo de controle da apoptose da via intrínseca e via Hippo em neoplasias mieloproliferativas.

2. Objetivo

- 1- Detectar alterações de expressão dos genes reguladores da via de sinalização Hippo e associá-las a fisiopatologia das NMP;
- 2- Estabelecer a potencial associação da via Hippo com a resistência à apoptose nas NMP.
- 3- Avaliar o perfil de citocinas dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas e indivíduos controles e correlacionar com a expressão dos genes da via Hippo e dados clínico laboratoriais.

2.1. Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo proposto

- Pesquisa da mutação CALR nos pacientes com TE e MF negativos para a mutação JAK2V617F;
- Quantificação da expressão gênica de *MST1/2*, *LATS1/2*, *MOB1A/B*, *SAVI*, *YAP* e *TAZ*, bem como de *AURKA* e *AURKB* em leucócitos e células CD34⁺ da medula óssea de pacientes com PV, TE e MF e controles;
- Quantificação da expressão de genes pró e anti apoptóticos *BAD*, *BAK*, *BCL-2* e *BCL-XL* e sua correlação com a expressão de genes da via Hippo em leucócitos de pacientes com PV, TE e MF e controles.
- Quantificação da expressão proteica dos componentes da via Hippo que apresentaram alteração da expressão gênica em células de pacientes com PV, TE, MF e controles;
- Avaliação do perfil de produção de citocinas e quimiocinas plasmáticas e correlação com dados clínicos e com a expressão dos genes da via Hippo.
- Correlação entre os níveis de expressão de *MST1/2*, *LATS1/2*, *MOB1A/B*, *SAVI*, *YAP* e *TAZ* com os dados laboratoriais dos pacientes;

3. Fluxograma dos Experimentos

Figura 2 - Fluxograma dos ensaios experimentais realizados durante o desenvolvimento do projeto de doutorado. O fluxograma ilustra os ensaios realizados com as amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes e controles.

4. Casuística

O presente estudo foi realizado em colaboração com as Profas. Dras. Belinda Pinto Simões, Fabíola Traina e Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes do serviço de Hematologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, que auxiliaram na seleção dos pacientes do estudo. Os indivíduos controles foram recrutados na comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e nas cidades da região de Ribeirão Preto.

A colheita das amostras foi realizada em pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária, sem tratamento, atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP). Foram também incluídas no trabalho amostras provenientes do biorrepositório do laboratório de Hematologia de responsabilidade da professora Dra. Fabíola Attié de Castro (Anexo A). Foram estudadas 148 amostras de sangue periférico, sendo 35 amostras de pacientes com TE, 31 amostras de pacientes com PV, 22 amostras de pacientes com MF e 60 amostras de indivíduos controles e 57 amostras de medula óssea, sendo 20 amostras de pacientes com TE, 15 amostras de pacientes com PV, 7 amostras de pacientes com MF e 15 amostras de indivíduos controles (Apêndices A - D).

Os critérios de exclusão de pacientes foram o uso de tratamento citorredutor ou quimioterápico, presença de outras neoplasias, doenças autoimunes, HIV ou diabetes. Os critérios de exclusão para controles foram a presença de neoplasias, doenças autoimunes, viroses, HIV ou diabetes. Todos pacientes e controles anuíram à participação na pesquisa por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos D - F) estabelecido pelo Conselho Nacional de Saúde (lei 466/2012) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) (Anexo B) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) (Anexo C) protocolo n° 348.

5. Material e Métodos

5.1. Colheita das amostras de sangue periférico e medula óssea

Todos os participantes do projeto de pesquisa realizaram a doação de 20 mL de sangue periférico, coletados em tubo a vácuo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Vacutainer®; Becton, Dickinson and Company). O sangue foi colhido por punção venosa no antebraço com cuidados de biossegurança e bioética.

A medula óssea foi obtida pelo médico hematologista no momento da biópsia ou da doação de medula óssea para transplante e 5 mL do volume total, em tubo a vácuo contendo o anticoagulante EDTA, foram designados à esta pesquisa.

5.2. Determinação dos parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos: contagem de glóbulos vermelhos (GV), glóbulos brancos (GB), número de plaquetas (Pqt), concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a distribuição das células vermelhas (do inglês - *Red Cell Distribution Width* - RDW) foram determinados usando o equipamento automático ABX Micros 60 (HORIBA ABX SAS).

5.3. Isolamento de leucócitos do sangue periférico dos pacientes e indivíduos controles

Os leucócitos totais do sangue periférico de pacientes e controles foram separados por meio do princípio de diferença de densidade entre leucócitos, hemácias e plaquetas, pelo método Haes-Steril (Voluven, Fresenius Kabi), que consistiu da adição de 1 parte de Haes-Steril a 4 partes do sangue total seguido da decantação por 90 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 400 x g (Centrifuge 5810R – Eppendorf) por 15 minutos. Os leucócitos foram ressuspensos em tampão salina-fosfato (PBS - pH=7,4) e contados em câmara de Neubauer utilizando o corante Trypan blue solução 0,4% (Sigma-Aldrich). O total de 1×10^7 células foram separadas para extração de RNA, sendo condicionadas em Trizol® (Invitrogen Life Technologies®) e 2×10^6 células armazenadas em tampão de fosfolipoproteína (Tris-HCL, NaCl, EDTA, Igepal CA) acrescido de 10% do inibidor de fosfatase (pirofosfato de sódio, ortovanadato de sódio e b-glicerol) e 1% do inibidor de protease (PIC - do inglês *Protease Inhibitor cocktail*) (Sigma-Aldrich) para a posterior obtenção do lisado proteico e execução do ensaio de Western-Blot.

5.4. Obtenção de células precursoras hematopoéticas CD34⁺

Os precursores hematopoéticos da medula óssea foram separados pela diferença de densidade pelo Ficoll-paque Plus (GE Healthcare) e em seguida lavados em tampão PBS-ACD acrescido de 0,05% de albumina e ressuspensos neste mesmo tampão. A separação das células progenitoras CD34 positivas (CD34⁺) foi realizada utilizando-se anticorpo monoclonal conjugado à microesferas (*beads*) magnéticas (MidiMACS® - Miltenyi Biotect) e com auxílio de colunas imunomagnéticas. Basicamente, as amostras foram centrifugadas e ao precipitado celular foi adicionado o anticorpo *Fc-bloking* e o anticorpo primário anti-CD34-hapteno e as amostras foram incubadas à 4°C por 20 minutos na ausência de luz.

Em seguida, foram adicionados 30 mL de tampão PBS-ACD-Albumina e a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 240 x g a 4°C. Após a centrifugação, foi adicionado ao precipitado celular o anticorpo secundário anti-hapteno (Miltenyi Biotect) conjugado às microesferas magnéticas e incubado novamente à 4°C por 20 minutos na ausência de luz. Foi adicionado 20 mL de tampão PBS-ACD-Albumina e centrifugado por 10 minutos a 240 x g a 4°C e os precipitados celulares foram ressuspensos em 10 mL de tampão PBS-ACD-Albumina.

Pelo princípio de seleção imunomagnéticas positiva, as células de interesse conjugadas às microesferas magnéticas permanecem aderidas à coluna enquanto as demais células passam diretamente pela mesma. As células CD34⁺ foram eluídas da coluna utilizando PBS-ACD-Albumina e centrifugadas por 10 minutos a 240 x g a 4°C. O precipitado celular foi ressuspenso em meio RPMI 1640 (Gibco) e as células contadas em câmara de Neubauer. A pureza da população CD34⁺ foi verificada por citometria de fluxo e foram consideradas adequadas para uso aquelas amostras com porcentagem acima de 85% de pureza. Os precursores hematopoéticos da medula óssea foram congelados em 0,5 mL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies®) para posterior extração de RNA.

5.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

Os leucócitos totais do sangue periférico e as células CD34⁺ de medula óssea de pacientes e controles nas concentrações de 1x10⁷/mL e 2x10⁶/mL, respectivamente, foram submetidos à extração de RNA pelo método de Trizol® (Invitrogen Life Technologies®).

Às células lisadas em trizol foram adicionados 10 µL de glicogênio (20 µg/µL) seguida de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 300 µL de

clorofórmio gelado, a amostra foi agitada por 15 segundos com auxílio do vórtex e centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos à 4° C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado seguido de homogeneização. As amostras foram armazenadas a - 20° C por 18 horas e então centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos à 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado seguido de nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos à 4° C. O sobrenadante foi desprezado e após secas, as amostras foram ressuspensas em água livre de DNase e RNase. A quantificação do RNA foi realizada no aparelho *NanoVue Spectrophotometer* (GE Healthcare) a 260 nM.

As reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando 1 µg de RNA por meio do *kit High Capacity cDNA reverse transcription*® (Applied Biosystems®). A polimerização das novas fitas de DNA complementar (cDNA) foi realizada em aparelho termociclador (Mastercycler, Eppendorf) a 25° C durante 10 minutos para promover o anelamento dos primers, seguido de 2 horas a 37° C para a extensão das novas fitas.

5.6. Quantificação dos genes por PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados no aparelho StepOnePlus (Thermo Fisher) empregando-se amostras de cDNA obtidas dos leucócitos e células CD34⁺ da medula óssea de pacientes e controles. Para os ensaios de PCR em tempo real da via Hippo foi empregado o *kit TaqMan gene expression assay* (Applied Biosystems®) e as sondas da via Hippo utilizadas estão descritas na tabela 4.

Para os ensaios de PCR em tempo real para detecção da expressão dos genes pró e anti apoptóticos foi empregado o *kit Sybr green master mix* (Thermo Fisher). A sequência dos oligonucleotídeos (primers) empregados na amplificação dos genes alvo estão descritos na tabela 5.

Tabela 4 - Sondas TaqMan utilizadas nos ensaios de quantificação da expressão gênica dos genes alvo da via Hippo e dos genes de referência (*GAPDH* e *BETA-ACTINA*).

Gene	Referência TaqMan Life Technologies
<i>MST1</i>	Hs00360684_m1
<i>MST2</i>	Hs00169491_m1
<i>SAV1</i>	Hs00560416_m1
<i>LATS1</i>	Hs00177987_m1
<i>LATS2</i>	Hs00324396_m1
<i>MOB1A</i>	Hs00217172_m1
<i>MOB1B</i>	Hs01397675_m1
<i>TAZ</i>	Hs00794094_m1
<i>YAP</i>	Hs00371735_m1
<i>AUKRA</i>	Hs01582072_m1
<i>AURKB</i>	Hs00177782_m1
β - <i>ACTINA</i>	4326315E
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1

Tabela 5 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de quantificação da expressão gênica dos genes alvo e genes de referência (*GAPDH* e *BETA-ACTINA*)

Gene	Primer sense	Primer anti-sense
<i>BAD</i>	GGTAGGAGCTGTGGCGACT	CCGAGTGAGCAGGAAGACTC
<i>BAK</i>	ACAAACTGGCCCAACAGAAC	TCTGGCCCTACACGTCTACC
<i>BCL-2</i>	ACGAGTGGGATGCGGGAGATGTG	GCGGTAGCGGCGGGAGAAGTC
<i>BCL-X_L</i>	TGGATGTCAGGTCACTGAA	CTGAATCGGAGATGGAGACC
<i>B-ACTINA</i>	GACAGCAGTCGGTTGGACC	CAGGTAAGCCCTGGCTGC
<i>GAPDH</i>	GGAGAAGGCTGGGGTCAT	GTCCTTCCACGATACCAAAGTT

Os resultados foram expressos em unidade relativa de expressão ($URE = 10000/2^{\Delta Ct}$) para as amostras de pacientes e controles

Delta CT = CT do gene alvo – média geométrica dos CTs dos genes referência

$$URE = 10000/2^{\Delta Ct}$$

5.7. Extração de DNA

Após a extração do RNA pelo método do Trizol®, as amostras foram submetidas à extração do DNA pela precipitação com etanol 100%. Inicialmente o DNA foi precipitado utilizando 0,4 mL de etanol 100% seguido de uma centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a 4° C. Em seguida, as amostras foram lavadas com 1 mL de solução de citrato de sódio 0,1 M em etanol 10%. Deixou-se o precipitado em temperatura ambiente por 30 minutos vertendo-se periodicamente e em seguida centrifugou-se novamente a 12.000 rpm por 5 minutos a 4° C. O precipitado foi então ressuspensão em 2 mL de etanol 75% e mantido em repouso em temperatura ambiente por 20 minutos, seguido de nova centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a 4° C. O DNA precipitado secou em temperatura ambiente por 10 minutos e foi dissolvido em 100 µL de água ultrapura e aquecido a 70° C por 20 minutos.

A quantificação do DNA e a qualidade do mesmo foram avaliadas no aparelho *NanoVue Spectrophotometer* (GE Healthcare) a 260 nM.

5.8. Detecção da mutação CALR nas amostras JAK2V617F negativas

A pesquisa de mutações *indel*, caracterizada por inserções ou deleções no éxon 9 do gene da calreticulina, foi realizada de acordo com a publicação de Chi e colaboradores (CHI et al., 2014). A pesquisa da mutação foi realizada por uma reação de PCR, seguida pela verificação da amplificação do produto em gel de agarose por eletroforese e posterior sequenciamento por análise de fragmentos.

Para a reação de PCR, foi utilizado o DNA na concentração de 100 ng no volume final de 30 µL, no qual foram adicionados 3 µL de solução-tampão (10X); 1,5 µL de MgCl₂ (50mM); 1,5µL de DMSO; 2µL de dNTP (10 mM); 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL), 0,3µL a 10µM dos iniciadores sense (5'-TAACAAAGGTGAGGCCTGGT-3'(6-FAM-labeled)) e antisense (5'-GCCTCTCTACAGCTCGTCCTT-3') e água ultrapura em quantidade suficiente para 30 µL. O primer sense foi marcado com a sonda fluorescente 6-FAM, o que possibilitou a posterior análise dos fragmentos no sequenciamento.

A reação do PCR foi executada nas seguintes condições: 10 minutos de desnaturação a 94°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e uma etapa final a 72°C durante 10 minutos. Após a amplificação, os produtos foram aplicados em gel de agarose 4% e analisados.

Alelos selvagens apresentam bandas com 297 pares de base (pb), enquanto que bandas de 245 pares de bases indicam a mutação do Tipo 1, caracterizado pela deleção de 52 pb e, bandas de 302 pb indicam a mutação do Tipo 2, correspondente da inserção de 5pb. Na figura abaixo, está exemplificado o PCR de sete diferentes amostras dos pacientes com NMP aqui estudados (Figura 3).

Devido ao pequeno número de pares de bases que diferenciam as bandas selvagens e mutadas foi necessário a análise de fragmentos por sequenciamento que foi realizada utilizando-se 1 µL do produto da PCR diluído em 1 µL de água ultrapura e adicionado de 8,7 µL de Formamida e 0,3 µL de 600 LIZ. As reações foram sequenciadas no aparelho ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Life Technologies) e os resultados analisados pelo Software do próprio sequenciador.

Figura 3 - PCR para a pesquisa da mutação CALR em amostras de DNA de pacientes com NMP. As amostras SPP7, SPP15, SPP88 e SPP113 apresentam apenas uma banda, indicando que não possuem alterações no gene da CALR, enquanto que as amostras SPP12, SPP56 e SPP127 apresentam duas bandas, indicando a presença da mutação no gene da CALR. SPP = sangue periférico de paciente.

5.9. Quantificação das proteínas pela técnica de Western Blot

As amostras de lisados de proteínas foram obtidas a partir de 2×10^6 células de pacientes e controles foram utilizadas para a detecção das proteínas LATS1, LATS2, MST1, MST2, SAV1, YAP/TAZ e β -actina (controle endógeno da concentração proteica dos lisados) pela técnica de *western blot*. Inicialmente os lisados proteicos passaram por eletroforese com corrente elétrica de 100 volts, seguida da transferência a 0,35 amperes para membranas de fluoreto de polivinidileno (PVDF). Em seguida, as membranas foram submetidas ao bloqueio com albumina de soro bovino (BSA do inglês - *bovine serum albumin*) por trinta minutos e então incubadas com os anticorpos primários citados acima diluídos 1:1000 para β -actina e 1:250 para LATS1, LATS2, MST1, MST2, SAV1, YAP/TAZ por 18 horas a 20° C. As marcações com os anticorpos secundários foram realizadas após três lavagens das membranas com TBS-T (Tris buffered saline tween 20) por 10 minutos cada. Os anticorpos secundários anti-mouse IgG ou anti-Rabbit IgG foram diluídos 1:5000 para a revelação das bandas de β -actina e 1:1000 para a revelação das bandas de LATS1, LATS2, MST1, MST2, SAV1, YAP/TAZ. As membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por 10 minutos cada e reveladas após adição do substrato quimioluminescente *ECL* (GE Healthcare). A quantificação das bandas foi realizada pelo programa ImageQuant (GE Healthcare).

5.10. Dosagem de citocinas e quimiocinas

Para quantificação das citocinas de pacientes com NMP e controles foi empregado o kit multiplex customizado que determinou os níveis plasmáticos de GM-CSF, IFN- α 2, IFN- γ , proteína induzida por interferon- γ (IP-10), MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α , e as interleucinas: IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, e IL-17A (16-plex, EMD Millipore Corporation). A fluorescência foi capturada em um leitor de placas com base em *beads* fluorescentes (Luminex1 MAGPIX1 System; Luminex Corporation).

Foram quantificadas as citocinas de 11 pacientes com TE, 16 pacientes com MF e 20 pacientes com PV e de 34 indivíduos controles e os dados foram analisados utilizando-se o *software* Milliplex Analyst software v3.5 (Millipore; VigeneTech Inc.), empregando-se curva de três parâmetros logísticos.

6. Análise estatística

O software Prisma 5.0 (GraphPad Software) foi utilizado para a realização das análises estatísticas convencionais. A análise comparativa da expressão dos genes envolvidos na regulação da via Hippo, ciclo celular e apoptose nos grupos de controles e pacientes com TE, PV e MF, assim como a comparação dos dados de expressão dos genes da via Hippo entre pacientes JAK2 negativos e positivos, bem como CALR negativos e positivos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney, quando comparado dois grupos, entretanto, nas análises onde comparou-se os três grupos de neoplasias mieloproliferativas foi empregado o teste estatístico oneway ANOVA Kruskal-Wallis com post teste de Dunns.

A correlação de *Spearman* foi empregada nas análises de correlação entre os genes da via Hippo e os genes relacionados à apoptose, bem como entre os valores de expressão de genes da via Hippo e citocinas nos diferentes grupos de pacientes. Foram considerados significantes os resultados cujo valor de p foi $<0,05$.

A análise do perfil de citocinas foi avaliada para caracterizar o padrão geral de citocinas de cada grupo, conforme sugerido anteriormente por Vitelli-Avelar e colaboradores (VITELLI-AVELAR et al., 2008), onde as porcentagens de produção de citocinas/quimiocinas foram agrupadas usando uma plataforma de quatro passos, modificada da seguinte forma: (I) análise estatística convencional; (II) estabelecimento da mediana global de citocinas/quimiocinas para cada grupo; (III) classificação de cada grupo como produtores de citocinas baixo ou alto, utilizando os valores médios globais como ponto de corte; (IV) criação de diagramas em escala preto e branco para cada grupo. Essas abordagens têm sido relevantes para detectar, com alta sensibilidade, pequenas alterações nos perfis imunológicos que não são detectáveis por abordagens estatísticas convencionais (COELHO-DOS-REIS et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2015; VITELLI-AVELAR et al., 2008)

A correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas foram compilados utilizando o software Cytoscape (version 2.8; <http://www.cytoscape.org>) (SHANNON et al., 2003). As redes de conexões foram construídas usando o modelo de círculos e o formato e a espessura das linhas exibem a pontuação do índice de correlação (r) como negativa ($r < 0$), fraca ($r \leq 0.35$), moderada ($0.36 \geq r \leq 0.67$), e forte ($r \geq 0.68$) (TAYLOR, 1990).

Os valores da média da concentração das diferentes citocinas foram calculados e empregados como ponto de corte para classificar cada indivíduo (paciente ou controle) como produtor "alto" ou "baixo" para determinada citocina/quimiocina. Em seguida, os dados foram organizados em diagramas preto e branco para mostrar a frequência de altos produtores para

cada grupo clínico. Os dados relevantes ($\geq 50\%$ de frequência) foram realçados em negrito e sublinhados nas figuras.

Os gráficos do tipo radar foram construídos usando o Microsoft Excel (Microsoft Office 2016) para caracterizar a frequência geral de indivíduos (controles e pacientes) que expressaram altos níveis de cada citocina/quimiocina em cada grupo estudado.

7. Resultados

O grupo controle foi composto por 60 indivíduos com média de idade de 56 anos, sendo 21 do gênero masculino e 39 do gênero feminino. O grupo de pacientes com TE foi composto por 35 indivíduos com idade média de 59 anos, sendo nove do gênero masculino e 26 do gênero feminino; do total, 15 indivíduos apresentavam a mutação JAK2V617F e dentre àqueles negativos, nove apresentavam a mutação CALR. O grupo de pacientes com MF foi composto por 22 indivíduos com idade média de 62 anos, sendo 15 do gênero masculino e sete do gênero feminino; do total, 12 apresentaram a mutação JAK2V617F e dentre àqueles negativos cinco apresentaram a mutação CALR. O grupo de pacientes com PV foi composto por 31 indivíduos com idade média de 65 anos, sendo 14 indivíduos do gênero masculino e 17 do gênero feminino; do total, 30 apresentaram a mutação JAK2V617F (Tabela 6). Os dados demográficos de cada participante da pesquisa estão descritos nos apêndices A - D. Um resumo dos principais achados para cada uma das neoplasias mieloproliferativas aqui estudadas estão descritos no apêndice E.

Tabela 6 - Dados demográficos e *status* mutacional dos pacientes com NMP e controles.

	CTRL	TE	MF	PV
Idade (anos)^a	56 (31 - 83)	59 (20 - 81)	62 (44 - 80)	65 (39 - 83)
Masculino	21 (35%)	9 (26%)	15 (68%)	14 (45%)
Feminino	39 (65%)	26 (74%)	7 (32%)	17 (56%)
JAK2V617F^b	-	15 (43%)	12 (54%)	30 (97%)
CALR^b	-	9 (26%)	5 (23%)	-

^a média e intervalo (entre parênteses). ^b Pacientes portadores da mutação.

Grupos: CTRL: Controle (indivíduos saudáveis); TE: trombocitemia essencial; MF: mielofibrose primária; PV: policitemia vera.

7.1. Expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em pacientes com Policitemia Vera e correlação com os dados laboratoriais

Na população de células CD34⁺ isoladas da medula óssea dos pacientes com PV, observou-se a diminuição da expressão dos genes *MOB1A* (p=0,0344), *TAZ* (p=0,0079), *AURKA* (p=0,0161) e *AURKB* (p=0,0011) em relação à células CD34⁺ do grupo CTRL (Tabela 7 e Figura 4), enquanto que na população de leucócitos totais isolados do sangue periférico observou-se a diminuição da expressão dos genes *LATS2* (p=0,0206), *MST1* (p=0,0098) e *MST2* (p=0,0003) no grupo de pacientes com PV em relação ao grupo CTRL.

(Tabela 7 e Figura 5). Não foi possível detectar a expressão do gene *YAP1* nas amostras de CD34⁺ e leucócitos avaliadas no grupo controle e de pacientes pela metodologia empregada.

A expressão dos genes alvo pertencentes à via Hippo foi analisada quanto a sua potencial associação ao gênero e não foi observada diferença dos níveis de expressão entre homens e mulheres (Tabela 8) nem conforme a idade dos pacientes (Tabela 8).

Os valores dos parâmetros laboratoriais e a expressão dos genes estudados indicaram a correlação negativa entre a contagem de plaquetas e a expressão do gene *LATS2* ($p=0,0243$; $r=-0,4036$), e quanto maior o número de plaquetas, menor a expressão desse gene (Tabela 9 e Figura 6). Não houve detecção da expressão proteica dos componentes da via Hippo em pacientes ou controles.

Tabela 7 - Valores das medianas e do p obtido nas análises comparativas dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em células CD34⁺ e leucócitos de controles e pacientes com PV.

GENE	CTRL	PV (CD34 ⁺)		GENE	CTRL	PV (Leucócitos)	
	Med.	Med.	Valor de p*		Med.	Med.	Valor de p*
<i>MST1</i>	212,57	146,58	0,0855	<i>MST1</i>	139,45	70,53	0,0098
<i>MST2</i>	450,94	552,54	0,2535	<i>MST2</i>	664,33	100,64	0,0003
<i>SAVI</i>	1614,39	1258,32	0,1808	<i>SAVI</i>	736,81	518,68	0,2636
<i>LATS1</i>	265,83	247,82	0,4342	<i>LATS1</i>	298,57	228,50	0,0515
<i>LATS2</i>	855,89	925,36	0,3093	<i>LATS2</i>	867,69	503,72	0,0206
<i>MOB1A</i>	35408,31	8070,56	0,0344	<i>MOB1A</i>	30565	19205	0,0738
<i>MOB1B</i>	1076,88	1028,41	0,4669	<i>MOB1B</i>	1037,5	868,6	0,7984
<i>TAZ</i>	967	315	0,0079	<i>TAZ</i>	229,12	323,14	0,5056
<i>AURKA</i>	230,53	124,96	0,0161	<i>AURKA</i>	51,52	47,55	0,3592
<i>AURKB</i>	1134,89	226,78	0,0011	<i>AURKB</i>	10,77	6,51	0,0949

CTRL: controle; PV: policitemia vera; med.: mediana. Os dados significativos estão destacados em amarelo. *valor de p em relação ao grupo controle. Teste estatístico correlação de Spearman.

Figura 4 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em células CD34⁺ de pacientes com PV e indivíduos controles. Os genes *MOB1A*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* estão diminuídos no grupo de pacientes com PV em comparação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Figura 5 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular nos leucócitos de pacientes com PV e indivíduos controles. Os genes *MST1*, *MST2* e *LATS2* estão diminuídos no grupo de pacientes com PV em comparação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 8 - Resultados das análises de correlação entre a expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular com e a idade e gêneros de pacientes com PV.

GENE	Idade Valor de correlação (r) e valor de p*	GENE	Med. (Feminino)	Med. (Masculino)	Valor de p*
<i>MST1</i>	r=-0,2862 p=0,1185	<i>MST1</i>	55,43	109,2	0,1709
<i>MST2</i>	r=-0,1395 p=0,4543	<i>MST2</i>	41,07	112,1	0,6198
<i>SAV1</i>	r=-0,2006 p=0,2792	<i>SAV1</i>	292,8	703,7	0,1366
<i>LATS1</i>	r=0,09809 p=0,5996	<i>LATS1</i>	233,6	212,8	0,5920
<i>LATS2</i>	r=-0,1770 p=0,3408	<i>LATS2</i>	455,8	630,8	0,5125
<i>MOB1A</i>	r=-0,1932 p=0,2978	<i>MOB1A</i>	19205	21913	0,5384
<i>MOB1B</i>	r=0,03088 p=0,8690	<i>MOB1B</i>	852,8	1294	0,3114
<i>TAZ</i>	r=-0,1441 p=0,4393	<i>TAZ</i>	315,5	352,2	0,8895
<i>AURKA</i>	r=-0,02382 p=0,8988	<i>AURKA</i>	23,36	77,43	0,1474
<i>AURKB</i>	r=-0,06701 p=0,7202	<i>AURKB</i>	4,638	8,150	0,3718

med.: mediana. Os dados significativos estão destacados em amarelo. *valor de p em relação ao gênero oposto. Análise estatística da idade foi realizada pela correlação de Spearman, enquanto que a análise estatística na comparação entre gêneros foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 9 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular e dados laboratoriais em pacientes com PV.

	<i>MST1</i>	<i>MST2</i>	<i>SAV1</i>	<i>LATS1</i>	<i>LATS2</i>	<i>MOB1A</i>	<i>MOB1B</i>	<i>TAZ</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>
GB	r=0,008469 p=0,9639	r=0,1573 p=0,9331	r=0,04557 p=0,8077	r=-0,05626 p=0,7637	r=-0,05082 p=0,7860	r=-0,01573 p=0,9331	r=-0,009679 p=0,9588	r=-0,1404 p=0,4514	r=0,1160 p=0,5345	r=0,06191 p=0,7408
GV	r=-0,1385 p=0,4574	r=-0,1500 p=0,4205	r=0,04859 p=0,7952	r=-0,1805 p=0,3313	r=-0,2904 p=0,1131	r=-0,2069 p=0,2642	r=-0,1125 p=0,5468	r=-0,2377 p=0,1978	r=-0,06190 p=0,7408	r=-0,1401 p=0,4521
Pqt	r=-0,3169 p=0,0824	r=-0,3431 p=0,0588	r=-0,07016 p=0,7076	r=-0,2831 p=0,1228	r=-0,4036 p=0,0243	r=-0,2863 p=0,1184	r=-0,1020 p=0,5850	r=-0,3230 p=0,0764	r=-0,2004 p=0,2797	r=-0,3218 p=0,0775
Hb	r=-0,3263 p=0,0732	r=-0,2567 p=0,1633	r=-0,2462 p=0,1818	r=-0,2136 p=0,2487	r=-0,2226 p=0,2286	r=-0,1946 p=0,2941	r=-0,04760 p=0,7993	r=-0,1999 p=0,2811	r=0,03227 p=0,8632	r=-0,2642 p=0,1510
Ht	r=-0,2656 p=0,1488	r=-0,2504 p=0,1742	r=-0,1587 p=0,3939	r=-0,2623 p=0,1540	r=-0,2678 p=0,1453	r=-0,2343 p=0,2046	r=-0,06614 p=0,7237	r=-0,2387 p=0,1959	r=0,01553 p=0,9339	r=-0,2730 p=0,1373
VCM	r=0,02864 p=0,8785	r=0,00040 p=0,9983	r=-0,1271 p=0,4958	r=0,00423 p=0,9820	r=0,1728 p=0,3525	r=0,07401 p=0,6923	r=0,1089 p=0,5598	r=0,2140 p=0,2477	r=0,06454 p=0,7302	r=-0,03549 p=0,8497
HCM	r=0,009682 p=0,9588	r=0,02118 p=0,9100	r=-0,1416 p=0,4473	r=0,01331 p=0,9433	r=0,1763 p=0,3428	r=0,08210 p=0,6606	r=0,1354 p=0,4678	r=0,2146 p=0,2563	r=0,03106 p=0,8682	r=-0,02481 p=0,8946
CHCM	r=-0,1598 p=0,3906	r=-0,03086 p=0,8691	r=-0,2142 p=0,2472	r=-0,03490 p=0,8522	r=0,02179 p=0,9074	r=0,2481 p=0,8946	r=0,03409 p=0,8555	r=0,00605 p=0,9742	r=-0,09622 p=0,6066	r=-0,09178 p=0,6234
RDW	r=0,06767 p=0,7224	r=0,02760 p=0,8849	r=0,1331 p=0,4832	r=0,2400 p=0,2015	r=-0,04140 p=0,8280	r=0,05899 p=0,7568	r=0,08058 p=0,6721	r=-0,1051 p=0,5806	r=0,1816 p=0,3367	r=0,08147 p=0,6788

GB: glóbulos brancos; GV: glóbulos vermelhos; PQT: plaquetas; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: variação de tamanho – do inglês *Red Cell Distribution Width*. med.: mediana. *valor de p para cada correlação. Teste estatístico correlação de Spearman. Os dados significativos estão destacados em amarelo.

Figura 6 - Correlação negativa entre os níveis de expressão do gene *LATS2* e o número de plaquetas em pacientes com PV. Os dados de expressão gênica estão expressos em unidades relativas de expressão (URE) e as plaquetas em unidade de medida $10^3/\mu\text{L}$. Teste estatístico correlação de Spearman.

7.2. Expressão dos genes *BAD*, *BAK*, *BCL-2* e *BCL-X_L* em pacientes com Policitemia Vera e correlação com a expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular

A quantificação dos níveis de expressão dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* e dos genes anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-X_L* foi realizada em leucócitos do sangue periférico de pacientes com PV. Foi observada a menor expressão dos genes *BAD* ($p < 0,0001$) e *BAK* ($p < 0,0001$) no grupo de pacientes em relação ao grupo CTRL, enquanto que os genes *BCL-2* ($p = 0,0273$) e *BCL-X_L* ($p < 0,0001$) apresentaram expressão aumentada nos pacientes com PV em relação ao grupo CTRL (Tabela 10, Figura 7).

As correlações entre os níveis de expressão do gene apoptótico *BAD* e dos genes da via Hippo *LATS 1* ($p = 0,0051$; $r = -0,5059$), *LATS2* ($p = 0,0051$; $r = -0,5064$), *MST1* ($p = 0,0056$; $r = -0,5010$), *MST2* ($p = 0,0289$; $r = -0,4059$), *MOB1A* ($p = 0,0087$; $r = -0,4783$), *MOB1B* ($p = 0,0002$; $r = -0,6414$) e *TAZ* ($p = 0,0054$; $r = -0,5030$) foram negativas. Não houve correlação entre os demais genes (Tabela 11, figura 8).

Tabela 10 - Resultados das análises comparativas entre os níveis de expressão dos genes pró- e anti - apoptóticos em leucócitos do sangue periférico de controles e pacientes com PV.

GENE	CTRL	PV (Leucócitos)	
	Med	Med	Valor de p*
<i>BAD</i>	37,68	0,4267	<0,0001
<i>BAK</i>	356,0	64,22	<0,0001
<i>BCL-2</i>	3,676	9,592	0,0273
<i>BCL-XL</i>	87	2202	<0,0001

CTRL: controle; PV: policitemia vera; med.: mediana. As análises estatísticas cujo valor de p foi significativo estão destacadas em amarelo. *valor de p em relação ao grupo controle. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Figura 7 - Níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos leucócitos de pacientes com PV e controles. Os genes *BAD* e *BAK* estão diminuídos no grupo de pacientes com PV em comparação ao grupo CTRL, enquanto que os genes *BCL-2* e *BCL-XL* estão aumentados no grupo de pacientes com PV em relação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 11 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular com os níveis de expressão de genes pró e anti apoptóticos em pacientes com PV.

GENE	<i>BAD</i>	<i>BAK</i>	<i>BCL-2</i>	<i>BCL-XL</i>
	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*
<i>MST1</i>	r=-0,5010 p=0,0056	r=-0,05726 p=0,7596	r=0,1952 p=0,2927	r=0,02137 p=0,9091
<i>MST2</i>	r=-0,4059 p=0,0289	r=-0,1165 p=0,5324	r=0,1794 p=0,3341	r=0,0002419 p=0,9897
<i>SAVI</i>	r=-0,2887 p=0,1288	r=-0,08226 p=0,6660	r=0,1718 p=0,3555	r=0,3008 p=0,1001
<i>LATS1</i>	r=-0,5059 p=0,0051	r=-0,2254 p=0,2228	r=0,04194 p=0,8228	r=-0,1621 p=0,3836
<i>LATS2</i>	r=-0,5064 p=0,0051	r=-0,1496 p=0,4218	r=0,1113 p=0,5512	r=-0,1911 p=0,3030
<i>MOB1A</i>	r=-0,4783 p=0,0087	r=-0,1371 p=0,4621	r=0,07379 p=0,6932	r=-0,1399 p=0,4528
<i>MOB1B</i>	r=-0,6414 p=0,0002	r=-0,1710 p=0,3578	r=0,07782 p=0,6773	r=-0,1649 p=0,3753
<i>TAZ</i>	r=-0,5030 p=0,0054	r=-0,1673 p=0,3682	r=0,09476 p=0,6121	r=-0,1702 p=0,3601
<i>AURKA</i>	r=-0,3581 p=0,0564	r=0,02863 p=0,8785	r=0,1859 p=0,3167	r=-0,1431 p=0,4424
<i>AURKB</i>	r=-0,3606 p=0,0547	r=0,09718 p=0,6030	r=0,1718 p=0,3555	r=-0,05323 p=0,7761

Os dados significativos estão destacados em amarelo. *valor de p em relação ao grupo controle. Teste estatístico correlação de Spearman.

Figura 8 - Correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular com a expressão do gene pró-apoptótico *BAD* em pacientes com PV. Os genes *MST1*, *MST2*, *LATS2*, *LATS2*, *MOB1A*, *MOB1B* e *TAZ* se correlacionaram negativamente com o gene pró-apoptótico *BAD*. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). Teste estatístico correlação de Spearman.

7.3. Expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em pacientes com Trombocitemia Essencial e correlação com parâmetros laboratoriais

Na população de células CD34⁺ isoladas da medula óssea dos pacientes foi detectada a diminuição da expressão dos genes *MOB1A* (p=0,0237), *TAZ* (p=0,0145), *AURKA* (p=0,0094) e *AURKB* (p=0,0158) em relação ao grupo CTRL (Tabela 12 e Figura 9), enquanto que na população de leucócitos totais isolados do sangue periférico foi observada a diminuição da expressão dos genes *LATS1* (p=0,0470), *LATS2* (p=0,0159), *MST1* (p=0,0250) e *SAVI* (p<0,0001) em relação ao grupo CTRL (Tabela 12 e Figura 10). Não houve detecção da expressão do gene *YAP1*.

A expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular foi similar para os pacientes que apresentam a mutação JAK2V617F e para àqueles negativos para esta mutação (Tabela 13).

Pacientes com a mutação CALR apresentam aumento da expressão dos genes *MOB1B* (p=0,0186) e *SAVI* (p=0,0409) em relação aos pacientes negativos para a mutação (Tabela 13 e Figura 11). A análise comparativa entre os pacientes positivos para a mutação JAK2V617F e àqueles positivos para a mutação CALR mostrou maior expressão do gene *SAVI* (p=0,0381) no grupo positivo para a mutação CALR em relação ao grupo positivo para a mutação JAK2V617F (Tabela 13 e Figura 11).

Os pacientes foram ainda analisados quanto à relação dos níveis de expressão gênica e gênero. Não houve diferença na expressão gênica entre homens e mulheres (Tabela 14). A correlação entre a expressão gênica e a idade dos pacientes não indicou a potencial diferença na expressão do gene estudado conforme a idade (Tabela 14).

Não houve correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e dos do ciclo celular com os dados laboratoriais dos pacientes com TE (Tabela 15). Não houve detecção da expressão proteica dos componentes da via Hippo em pacientes ou controles.

Tabela 12 - Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em células CD34⁺ e leucócitos de indivíduos controles e pacientes com TE.

GENE	CTRL		TE (CD34 ⁺)		GENE	CTRL		TE (Leucócitos)	
	Med.	Med.	Valor de p*			Med.	Med.	Valor de p*	
<i>MST1</i>	212,57	196,12	0,3027		<i>MST1</i>	139,45	84,00	0,0250	
<i>MST2</i>	450,94	1273,54	0,3027		<i>MST2</i>	664,33	561,47	0,3854	
<i>SAV1</i>	1614,39	1622,11	0,1885		<i>SAV1</i>	736,81	90,70	<0,0001	
<i>LATS1</i>	265,83	215,47	0,4013		<i>LATS1</i>	298,57	183,30	0,0470	
<i>LATS2</i>	855,89	476,13	0,1057		<i>LATS2</i>	867,69	444,76	0,0159	
<i>MOB1A</i>	35408,31	14499,16	0,0237		<i>MOB1A</i>	30565	26147	0,2551	
<i>MOB1B</i>	1076,88	1365,17	0,4013		<i>MOB1B</i>	1037,5	1447,3	0,1989	
<i>TAZ</i>	967	505	0,0145		<i>TAZ</i>	229,12	421,41	0,2584	
<i>AURKA</i>	230,53	87,05	0,0094		<i>AURKA</i>	51,52	125,45	0,1685	
<i>AURKB</i>	1134,89	562,27	0,0158		<i>AURKB</i>	10,77	12,34	0,5870	

CTRL: controle; TE: trombocitemia essencial; med.: mediana. Os dados significativos estão destacados em amarelo. *valor de p em relação ao controle. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 9 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular nas células CD34⁺ de pacientes com TE e CTRL. Os genes *MOB1A*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* estão diminuídos no grupo de pacientes com TE em comparação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Figura 10 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular nos leucócitos de pacientes com TE e indivíduos controles. Os genes *MST1*, *SAV1*, *LATS1* e *LATS2* estão diminuídos no grupo de pacientes com PV em comparação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico Mann-Whitney.

Tabela 13 - Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular nos leucócitos de pacientes com TE conforme *status* mutacional.

GENE	JAK2V617F-	JAK2V617F+		GENE	CALR-	CALR+		GENE	JAK2V16F+	CALR+	
	Med	Med	Valor de p*		Med	Med	Valor de p*		Med	Med	Valor de p*
<i>MST1</i>	101,8	71,37	0,5597	<i>MST1</i>	65,05	121,8	0,1770	<i>MST1</i>	101,8	121,8	0,2134
<i>MST2</i>	608,8	525,9	0,9336	<i>MST2</i>	94,51	804,1	0,1535	<i>MST2</i>	608,8	804,1	0,4495
<i>SAV1</i>	109,2	74,01	0,4141	<i>SAV1</i>	42,85	138,1	0,0409	<i>SAV1</i>	109,2	138,1	0,0381
<i>LATS1</i>	244,7	150,3	0,2641	<i>LATS1</i>	151,6	278,2	0,1535	<i>LATS1</i>	244,7	278,2	0,2723
<i>LATS2</i>	480,1	366,7	0,3953	<i>LATS2</i>	382,3	559	0,2976	<i>LATS2</i>	480,1	559	0,2319
<i>MOB1A</i>	28645	19593	0,7769	<i>MOB1A</i>	15941	30818	0,3349	<i>MOB1A</i>	28645	30818	0,4208
<i>MOB1B</i>	1567	1194	0,6769	<i>MOB1B</i>	674,7	1973	0,0186	<i>MOB1B</i>	1567	1973	0,1317
<i>TAZ</i>	465,7	280,5	0,8545	<i>TAZ</i>	449,3	465,7	0,9079	<i>TAZ</i>	465,7	465,7	0,7511
<i>AURKA</i>	194,1	86,07	0,1786	<i>AURKA</i>	55,63	240,9	0,2908	<i>AURKA</i>	194,1	240,9	0,0673
<i>AURKB</i>	11,80	13,34	0,9601	<i>AURKB</i>	2,517	16,33	0,2318	<i>AURKB</i>	11,80	16,33	0,5101

Teste estatístico Mann-Whitney. Os dados significativos estão destacados em amarelo.

Figura 11 - Expressão dos genes *SAV1*, *MOB1B* e *AURKB* em leucócitos de pacientes com TE positivos conforme o *status* mutacional. Os genes *SAV1* e *MOB1B* estão mais expressos nos pacientes TE positivos para a mutação CALR. Os pacientes com TE positivos para a mutação CALR apresentam maior expressão do gene *AURKB* em comparação aos pacientes com a mutação JAK2V617F. Teste estatístico Mann-Whitney.

Tabela 14 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em leucócitos de pacientes com TE, idade e gênero.

GENE	Idade	GENE	Gênero		Valor de p*
	Valor de correlação (r) e valor de p*		Med. (Feminino)	Med. (Masculino)	
<i>MST1</i>	r=0,007148 p=0,9675	<i>MST1</i>	83,47	106,5	0,3600
<i>MST2</i>	r=-0,1512 p=0,3858	<i>MST2</i>	507,7	656,1	0,3459
<i>SAVI</i>	r=0,05074 p=0,7722	<i>SAVI</i>	87,27	118,3	0,4326
<i>LATS1</i>	r=-0,06629 p=0,7052	<i>LATS1</i>	172,8	184,3	0,4925
<i>LATS2</i>	r=-0,2015 p=0,2456	<i>LATS2</i>	450,9	366,7	0,2667
<i>MOB1A</i>	r=-0,2575 p=0,1354	<i>MOB1A</i>	25790	26147	0,3886
<i>MOB1B</i>	r=0,01542 p=0,9300	<i>MOB1B</i>	1363	2649	0,1679
<i>TAZ</i>	r=0,01822 p=0,9173	<i>TAZ</i>	472,8	257,7	0,1979
<i>AURKA</i>	r=-0,3330 p=0,0506	<i>AURKA</i>	131,6	104,0	0,4178
<i>AURKB</i>	r=-0,02332 p=0,1776	<i>AURKB</i>	12,10	17,79	0,4774

med.: mediana. *valor de p em relação ao gênero oposto. Análise estatística da idade foi realizada pela correlação de Spearman, enquanto que a análise estatística na comparação entre gêneros foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 15 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em leucócitos de pacientes com TE e parâmetros hematológicos.

	<i>MST1</i>	<i>MST2</i>	<i>SAV1</i>	<i>LATS1</i>	<i>LATS2</i>	<i>MOB1A</i>	<i>MOB1B</i>	<i>TAZ</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>
GB	r=-0,1392 p=0,4251	r=0,03557 p=0,8392	r=-0,09356 p=0,5929	r=-0,1927 p=0,2674	r=-0,09244 p=0,5974	r=-0,1345 p=0,4413	r=-0,1275 p=0,4656	r=0,1179 p=0,4999	r=-0,03445 p=0,8442	r=0,1947 p=0,2624
GV	r=-0,2196 p=0,2121	r=-0,1916 p=0,2776	r=-0,2931 p=0,0925	r=-0,1996 p=0,2578	r=-0,09460 p=0,5946	r=-0,2329 p=0,1850	r=-0,2107 p=0,2316	r=0,01360 p=0,9391	r=-0,1900 p=0,2819	r=0,08176 p=0,6457
Pqt	r=-0,09314 p=0,05946	r=0,1537 p=0,3782	r=0,1805 p=0,2993	r=-0,05280 p=0,7632	r=-0,08292 p=0,6358	r=0,04314 p=0,8056	r=0,2985 p=0,0816	r=0,06933 p=0,6923	r=0,1616 p=0,3536	r=0,2111 p=0,2235
Hb	r=-0,05773 p=0,7418	r=-0,1501 p=0,3895	r=-0,2305 p=0,1828	r=-0,2065 p=0,2339	r=0,01163 p=0,9471	r=-0,1616 p=0,3538	r=-0,1452 p=0,4054	r=0,00756 p=0,9656	r=-0,1407 p=0,4202	r=-0,1114 p=0,5241
Ht	r=-0,1336 p=0,4441	r=-0,3132 p=0,0669	r=-0,2268 p=0,1901	r=-0,1821 p=0,2951	r=0,00336 p=0,9847	r=-0,2522 p=0,1439	r=-0,1762 p=0,3112	r=0,02466 p=0,8882	r=0,2748 p=0,1101	r=-0,1477 p=0,3973
VCM	r=0,1698 p=0,3295	r=0,03446 p=0,8442	r=0,1541 p=0,3768	r=0,1629 p=0,3487	r=0,1381 p=0,4287	r=0,1694 p=0,3307	r=0,08504 p=0,6272	r=-0,0347 p=0,8429	r=0,1177 p=0,5008	r=-0,1855 p=0,2861
HCM	r=0,1269 p=0,4676	r=0,00644 p=0,9707	r=-0,03053 p=0,8618	r=0,01345 p=0,9389	r=-0,01289 p=0,9414	r=0,06022 p=0,7311	r=-0,01345 p=0,9389	r=-0,1580 p=0,3647	r=0,07703 p=0,6601	r=-0,2132 p=0,2189
CHCM	r=0,02887 p=0,8692	r=0,03420 p=0,8454	r=-0,1526 p=0,3814	r=-0,2105 p=0,2248	r=-0,1900 p=0,2742	r=-0,08914 p=0,6106	r=-0,1864 p=0,2836	r=-0,1039 p=0,5527	r=-0,01948 p=0,9116	r=-0,06980 p=0,6903
RDW	r=-0,2718 p=0,1142	r=-0,2355 p=0,1732	r=-0,3208 p=0,0602	r=-0,1042 p=0,5513	r=-0,2928 p=0,0878	r=-0,2090 p=0,2282	r=-0,2554 p=0,1387	r=-0,2875 p=0,0940	r=-0,3053 p=0,0745	r=-0,08630 p=0,6221

GB: glóbulos brancos; GV: glóbulos vermelhos; PQT: plaquetas; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: variação de tamanho – do inglês *Red Cell Distribution Width*. Teste estatístico correlação de Spearman.

7.4. Expressão dos genes pró e anti-apoptóticos *BAD*, *BAK*, *BCL-2* e *BCL-X_L* em pacientes com trombocitemia essencial e correlação com a expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular

A quantificação da expressão gênica dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* e dos genes anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-X_L* foi realizada em amostras de leucócitos do sangue periférico de pacientes com TE. Foi observada menor expressão dos genes *BAD* ($p < 0,0001$) e *BAK* ($p < 0,0001$) no grupo de pacientes em relação ao grupo controle. Os níveis de expressão dos genes *BCL-2* ($p < 0,0001$) e *BCL-X_L* ($p < 0,0001$) estavam aumentados nos pacientes com TE em relação ao grupo CTRL (Tabela 16, Figura 12).

Foram detectadas correlações negativas entre a expressão dos níveis de expressão dos genes *BAD* e *MST2* ($p = 0,0146$; $r = -0,4092$), *MOB1A* ($p = 0,0071$; $r = -0,4468$), *MOB1B* ($p = 0,0068$; $r = -0,4490$), *AURKA* ($p = 0,0073$; $r = -0,4454$) e *AURKB* ($p = 0,0040$; $r = -0,4748$). Não houve correlação detectada entre os demais genes analisados (Tabela 16, figura 13).

Tabela 16 - Resultados das análises comparativas, dos níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos leucócitos de controles e pacientes com TE.

GENE	CTRL	TE (Leucócitos)	
	Med	Med	Valor de p*
<i>BAD</i>	37,68	0,2212	<0,0001
<i>BAK</i>	356	59,82	<0,0001
<i>BCL-2</i>	3,676	49,82	<0,0001
<i>BCL-X_L</i>	87	408,8	<0,0001

CTRL: controle; TE: trombocitemia essencial; med.: mediana. Os dados significativos estão destacados em amarelo. *valor de p em relação ao grupo controle. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 12 - Níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos leucócitos de pacientes com TE e CTRL. Os genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* estão diminuídos no grupo de pacientes com TE em comparação ao grupo CTRL, enquanto que os genes anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-XL* estão aumentados no grupo de pacientes com TE em comparação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico Mann-Whitney.

Tabela 17 - Resultados das análises de correlação e valores de p entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular e genes pró e anti-apoptóticos em leucócitos pacientes com TE.

GENE	<i>BAD</i>	<i>BAK</i>	<i>BCL-2</i>	<i>BCL-X_L</i>
	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*
<i>MST1</i>	r=-0,2485 p=0,1501	r=0,05098 p=0,7712	r=0,1605 p=0,3570	r=0,2261 p=0,1916
<i>MST2</i>	r=-0,4092 p=0,0146	r=0,1171 p=0,5030	r=0,2630 p=0,1269	r=0,03165 p=0,8568
<i>SAVI</i>	r=-0,1389 p=0,4260	r=0,2462 p=0,1539	r=0,1221 p=0,4846	r=0,3342 p=0,0498
<i>LATS1</i>	r=-0,1801 p=0,1086	r=-0,08880 p=0,6120	r=-0,05742 p=0,7432	r=0,04538 p=0,7958
<i>LATS2</i>	r=-0,2759 p=0,1086	r=0,09776 p=0,5764	r=0,2597 p=0,1320	r=0,1322 p=0,4490
<i>MOB1A</i>	r=-0,4468 p=0,0071	r=0,01232 p=0,9440	r=0,2126 p=0,2201	r=0,06190 p=0,7239
<i>MOB1B</i>	r=-0,4490 p=0,0068	r=0,1888 p=0,2774	r=0,2476 p=0,1515	r=0,2202 p=0,2038
<i>TAZ</i>	r=-0,2048 p=0,2380	r=-0,06050 p=0,7299	r=0,1947 p=0,2624	r=-0,02521 p=0,8857
<i>AURKA</i>	r=-0,4454 p=0,0073	r=0,06751 p=0,700	r=0,2202 p=0,2038	r=0,08263 p=0,6370
<i>AURKB</i>	r=-0,4748 p=0,0040	r=-0,08852 p=0,6131	r=0,2146 p=0,2158	r=-0,07087 p=0,6858

Os dados significativos estão destacados em amarelo. *valor de p em relação ao grupo controle. Teste estatístico correlação de Spearman.

Figura 13 - Correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular e a expressão do gene pró-apoptótico BAD em pacientes com TE. Os genes *MST2*, *MOB1A*, *MOB1B*, *AURKA* e *AURKB* se correlacionaram negativamente com o gene pró-apoptótico BAD. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). Teste estatístico correlação de Spearman.

7.5. Expressão dos genes da via Hippo e de ciclo celular em pacientes com Mielofibrose Primária e correlação com os parâmetros hematológicos

Na população de células CD34⁺ isoladas da medula óssea dos pacientes com mielofibrose primária foi observada a diminuição da expressão do gene *AURKB* ($p=0,0068$) em relação ao grupo CTRL (Tabela 18 e figura 14), enquanto que na população de leucócitos totais isolados do sangue periférico foram detectados a diminuição da expressão dos genes *SAVI* ($p<0,0001$) e *TAZ* ($p=0,0007$) e aumento da expressão de *AURKB* ($p=0,0232$), em relação ao grupo CTRL (Tabela 18 e figura 15).

A comparação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo entre pacientes com mutação JAK2V617F e àqueles negativos mostrou diminuição da expressão do gene *MST1* ($p=0,0111$) em pacientes JAK2V617F positivos (Tabela 19 e figura 16). Foi detectado aumento da expressão do gene *AURKA* no grupo de pacientes positivo para a mutação CALR. (Tabela 19, figura 17). A análise comparativa dos níveis de expressão dos genes da via Hippo entre os pacientes positivos para a mutação JAK2V617F e a mutação CALR mostrou a maior expressão dos genes *MST1* ($p=0,0218$), *MOB1B* ($p=0,0277$) e *AURKB* ($p=0,0100$) no grupo positivo para a mutação CALR (Tabela 19 e figura 18).

Os níveis de expressão dos genes da via Hippo também foram analisados quanto ao gênero e idade (Tabela 20). Não foi observada correlação entre a expressão gênica e a idade e gênero dos pacientes (Tabela 20). Não houve detecção da expressão proteica dos componentes da via Hippo em pacientes ou controles.

Em relação às correlações com os dados laboratoriais, houve correlações negativas entre o número de glóbulos brancos e a expressão dos genes *MST1* ($p=0,0093$; $r=-0,5411$), *MOB1A* ($p=0,0202$; $r=-0,4914$) e *MOB1B* ($p=0,0428$; $r=-0,4355$), correlação negativa entre o número de plaquetas e a expressão dos genes *MST1* ($p=0,0019$; $r=-0,6251$) e *AURKB* ($p=0,0383$; $r=-0,4355$). Além disso, houve correlações negativas entre *LATS1* e HCM ($p=0,0342$; $r=-0,4531$) e *LATS1* e VCM ($p=0,0382$; $r=-0,4445$), bem como correlação negativa entre a expressão do gene *LATS2* e CHCM ($p=0,0233$; $r=-0,5045$) (Tabela 21 e figura 19).

Tabela 18 - Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em leucócitos e células CD34⁺ entre controles e pacientes com MF.

GENE	CTRL	MF (CD34 ⁺)		GENE	CTRL	MF (Leucócitos)	
	Med.	Med.	Valor de p*		Med.	Med.	Valor de p*
<i>MST1</i>	212,57	246,25	0,3362	<i>MST1</i>	139,45	148,34	0,6941
<i>MST2</i>	450,94	125,46	0,2864	<i>MST2</i>	664,33	728,24	0,7259
<i>SAV1</i>	1614,39	1803,93	0,4439	<i>SAV1</i>	736,81	66,156	<0,0001
<i>LATS1</i>	265,83	97,78	0,1797	<i>LATS1</i>	298,57	207,42	0,4480
<i>LATS2</i>	855,89	1109,06	0,2191	<i>LATS2</i>	867,69	592,12	0,2695
<i>MOB1A</i>	35408,31	26,88	0,4163	<i>MOB1A</i>	30565	42152	0,7338
<i>MOB1B</i>	1076,88	1666,52	0,0902	<i>MOB1B</i>	1037,5	1122,2	0,7259
<i>TAZ</i>	967	660	0,1619	<i>TAZ</i>	229,12	102,61	0,0007
<i>AURKA</i>	230,53	140,83	0,0793	<i>AURKA</i>	51,52	99,99	0,5214
<i>AURKB</i>	1134,89	302,66	0,0068	<i>AURKB</i>	10,77	29,67	0,0232

CTRL: controle; MF: mielofibrose primária; med.: mediana. Os dados significativos estão destacados em amarelo. *valor de p em relação ao controle. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 14 - Níveis de Expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular nas células CD34⁺ de pacientes com MF e indivíduos controles. O gene *AURKB* está diminuído no grupo de pacientes com MF em comparação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 15 - Níveis de Expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em leucócitos de pacientes com MF e indivíduos controles. Os genes *SAV1*, *TAZ* e *AURKB* estão diminuídos no grupo de pacientes com MF em relação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico Mann-Whitney.

Tabela 19 - Comparação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em leucócitos de pacientes com MF conforme *status* mutacional.

GENE	JAK2V617F-	JAK2V617F+		GENE	CALR-	CALR+		GENE	JAK2V16F+	CALR+	
	Med	Med	Valor de p*		Med	Med	Valor de p*		Med	Med	Valor de p*
<i>MST1</i>	223	95,01	0,0111	<i>MST1</i>	288,9	200	0,9143	<i>MST1</i>	95,01	200	0,0218
<i>MST2</i>	902	567,6	0,5752	<i>MST2</i>	495,1	910,2	0,1714	<i>MST2</i>	567,6	910,2	0,2417
<i>SAVI</i>	101,4	62,54	0,1213	<i>SAVI</i>	93,71	101,4	0,6095	<i>SAVI</i>	62,54	101,4	0,0678
<i>LATS1</i>	264,2	190,2	0,5752	<i>LATS1</i>	360,5	264,2	0,9143	<i>LATS1</i>	190,2	264,2	0,4824
<i>LATS2</i>	805,5	572,5	0,4098	<i>LATS2</i>	831,1	805,5	0,7619	<i>LATS2</i>	572,5	805,5	0,2815
<i>MOB1A</i>	52935	30649	0,1563	<i>MOB1A</i>	42065	63589	0,6095	<i>MOB1A</i>	30649	63589	0,1223
<i>MOB1B</i>	1733	794,2	0,806	<i>MOB1B</i>	1128	2835	0,2571	<i>MOB1B</i>	794,2	2835	0,0277
<i>TAZ</i>	110,2	84,33	0,1985	<i>TAZ</i>	141,9	102,6	0,6095	<i>TAZ</i>	84,33	102,6	0,4260
<i>AURKA</i>	108	61,22	0,4098	<i>AURKA</i>	45,70	140,7	0,0095	<i>AURKA</i>	61,22	140,7	0,0832
<i>AURKB</i>	69,67	16,44	0,1062	<i>AURKB</i>	26,42	163,9	0,1143	<i>AURKB</i>	16,44	163,9	0,0100

CTRL: controle; MF: mielofibrose primária; med.: mediana. Os dados significativos estão destacados em amarelo. *valor de p em relação ao controle. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 16 - Comparação dos níveis de expressão do gene *MST1* entre pacientes positivos e negativos para a mutação JAK2V617F, em leucócitos de pacientes com MF. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). O gene *MST1* foi menos expresso nos pacientes positivos para a mutação JAK2V617F. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 17 - Comparação dos níveis de expressão do gene *AURKA* entre pacientes positivos e negativos para a mutação CALR em leucócitos de pacientes com MF. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). O gene *AURKA* foi mais expresso nos pacientes positivos para a mutação CALR. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 18 - Comparação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular entre pacientes positivos para as mutações JAK2V617F e CALR. Expressão dos genes em leucócitos de pacientes com MF. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). Os genes *MST1*, *MOB1B* e *AURKB* são mais expressos nos pacientes positivos para a mutação CALR. Teste estatístico Mann-Whitney.

Tabela 20 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular dos leucócitos de pacientes com MF e a idade e gênero. Medianas e valores de p referentes às análises comparativas de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular de leucócitos de pacientes com MF segregados por gênero.

GENE	Idade	GENE	Gênero		Valor de p*
	Valor de correlação (r) e valor de p*		Med (Feminino)	Med (Masculino)	
<i>MST1</i>	r=0,04177 p=0,8464	<i>MST1</i>	145,2	150,4	0,7780
<i>MST2</i>	r=0,1497 p=0,4852	<i>MST2</i>	682,7	773,8	0,6723
<i>SAV1</i>	r=-0,09441 p=0,6608	<i>SAV1</i>	64,66	67,65	0,8325
<i>LATS1</i>	r=0,06787 p=0,7527	<i>LATS1</i>	204	208	0,8879
<i>LATS2</i>	r=0,1105 p=0,6072	<i>LATS2</i>	481,3	617,3	0,2904
<i>MOB1A</i>	r=0,2232 p=0,2945	<i>MOB1A</i>	36714	47416	0,6217
<i>MOB1B</i>	r=-0,01001 p=0,9630	<i>MOB1B</i>	899,5	1293	0,6723
<i>TAZ</i>	r=-0,1840 p=0,3893	<i>TAZ</i>	99,49	105,7	0,6217
<i>AURKA</i>	r=-0,05134 p=0,8817	<i>AURKA</i>	70,47	118,9	0,4809
<i>AURKB</i>	r=-0,05395 p=0,8023	<i>AURKB</i>	25,56	33,80	0,7245

CTRL: controle; MF: mielofibrose primária; med.: mediana. *valor de p em relação ao gênero oposto. Análise estatística da idade foi realizada pela correlação de Spearman, enquanto que a análise estatística na comparação entre gêneros foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Tabela 21 - Correlação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular de leucócitos de pacientes com MF com os dados laboratoriais.

	<i>MST1</i>	<i>MST2</i>	<i>SAV1</i>	<i>LATS1</i>	<i>LATS2</i>	<i>MOB1A</i>	<i>MOB1B</i>	<i>TAZ</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>
GB	r=-0,5411 p=0,0093	r=-0,3541 p=0,1059	r=-0,3733 p=0,0870	r=-0,1548 p=0,4917	r=-0,5611 p=0,1310	r=-0,4914 p=0,0202	r=-0,4355 p=0,0428	r=0,07568 p=0,7378	r=-0,2689 p=0,2263	r=-0,1152 p=0,6096
GV	r=-0,2105 p=0,3597	r=-0,01365 p=0,9532	r=-0,01559 p=0,9465	r=0,08447 p=0,7158	r=0,1806 p=0,4333	r=-0,1845 p=0,4233	r=-0,1657 p=0,4729	r=-0,0799 p=0,7306	r=-0,05133 p=0,8251	r=0,1366 p=0,5726
Pqt	r=-0,6251 p=0,0019	r=-0,2005 p=0,3711	r=-0,3010 p=0,1735	r=0,07284 p=0,7473	r=-0,1790 p=0,4254	r=-0,1756 p=0,4344	r=-0,2219 p=0,3209	r=-0,1756 p=0,4344	r=-0,2592 p=0,2441	r=-0,4444 p=0,0383
Hb	r=-0,3705 p=0,0896	r=-0,2954 p=0,1820	r=-0,1723 p=0,4433	r=-0,4525 p=0,1689	r=0,05140 p=0,8203	r=-0,3157 p=0,1523	r=-0,3773 p=0,0835	r=-0,1598 p=0,4774	r=-0,2576 p=0,2472	r=-0,1683 p=0,4540
Ht	r=-0,3920 p=0,0712	r=-0,2977 p=0,1785	r=-0,1909 p=0,3948	r=-0,1694 p=0,4509	r=0,06947 p=0,7587	r=-0,3118 p=0,1578	r=-0,3829 p=0,0786	r=-0,1802 p=0,4223	r=-0,2474 p=0,2670	r=-0,1661 p=0,4602
VCM	r=-0,1711 p=0,4464	r=-0,3688 p=0,0912	r=-0,2700 p=0,2243	r=-0,4445 p=0,0382	r=-0,2468 p=0,2681	r=-0,1694 p=0,4509	r=-0,2384 p=0,2854	r=-0,1723 p=0,4433	r=-0,2943 p=0,1837	r=-0,3558 p=0,1041
HCM	r=-0,2192 p=0,3270	r=-0,3497 p=0,1106	r=-0,2684 p=0,2272	r=-0,4531 p=0,0342	r=-0,3831 p=0,0785	r=-0,2277 p=0,3082	r=-0,2876 p=0,1944	r=-0,0824 p=0,7152	r=-0,2672 p=0,2293	r=-0,2972 p=0,1792
CHCM	r=-0,1734 p=0,4404	r=-0,03399 p=0,8806	r=-0,1309 p=0,5615	r=-0,02720 p=0,9044	r=-0,5045 p=0,0233	r=-0,1269 p=0,5736	r=-0,1331 p=0,5547	r=0,3445 p=0,1164	r=-0,01530 p=0,9461	r=-0,06969 p=0,7580
RDW	r=0,08077 p=0,7209	r=0,1971 p=0,3793	r=0,04349 p=0,8476	r=-0,2299 p=0,3034	r=0,2121 p=0,3696	r=0,2067 p=0,3560	r=0,3801 p=0,0810	r=0,08529 p=0,7059	r=0,2864 p=0,1964	r=0,1463 p=0,5159

GB: glóbulos brancos; GV: glóbulos vermelhos; PQT: plaquetas; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: variação de tamanho – do inglês *Red Cell Distribution Width*. Os dados significativos estão destacados em amarelo. Teste estatístico correlação de Spearman.

Figura 19 - Correlação entre a expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular com os dados laboratoriais dos pacientes com MF. Houve correlações negativas entre o número de glóbulos brancos e a expressão dos genes *MST1*, *MOB1A* e *MOB1B*, correlação negativa entre o número de plaquetas e a expressão dos genes *MST1* e *AURKB*. Além disso, houve correlações negativas entre *LATS1*, HCM e VCM, bem como correlação negativa entre a expressão do gene *LATS2* e CHCM. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE) para a expressão gênica e nas unidades de medida: $10^3/\mu\text{L}$ para plaquetas e glóbulos brancos; fl para VCM; pg para HCM e g/dL para CHCM.

7.6. Expressão dos genes pró e anti apoptóticos *BAD*, *BAK*, *BCL-2* e *BCL-XL* em pacientes com mielofibrose primaria e sua correlação com a expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular

A quantificação da expressão gênica dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* e dos genes anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-XL* foi realizada em amostras de leucócitos do sangue periférico de pacientes com MF. Observou-se menor expressão dos genes *BAD* ($p < 0,0001$), e *BAK* ($p = 0,0350$), no grupo de pacientes em relação ao grupo controle, enquanto que os genes *BCL-2* e *BCL-XL* não estavam diferencialmente expressos nos pacientes com MF em relação ao grupo CTRL (Tabela 22, figura 20).

Houveram correlações negativas entre a expressão do gene *BAK* com *SAVI* ($p = 0,0499$; $r = -0,4229$); *BCL-2* com *MST1* ($p = 0,0263$; $r = -0,4726$), *MST2* ($p = 0,0453$; $r = -0,4308$), *MOB1A* ($p = 0,0204$; $r = -0,4907$) e entre *BCL-XL* e *MST1* ($p = 0,0109$; $r = -0,5313$), *SAVI* ($p = 0,0073$; $r = -0,5551$), *MOB1A* ($p = 0,0092$; $r = -0,5415$) e *MOB1B* ($p = 0,0346$; $r = -0,4523$). Não houve correlação entre os demais genes (Tabela 23, figura 21).

Tabela 22 - Resultados das análises comparativas de níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos em leucócitos de controles e pacientes com MF.

GENE	CTRL	MF (Leucócitos)	
	Med	Med	Valor de p*
<i>BAD</i>	37,68	0,5279	$p < 0,0001$
<i>BAK</i>	356	160,8	$p = 0,0350$
<i>BCL-2</i>	3,676	9,062	$p = 0,1124$
<i>BCL-XL</i>	87	172,9	$p = 0,2016$

Test estatístico Mann-Whitney.

Figura 20 - Níveis de expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos leucócitos de pacientes com MF e indivíduos CTRL. Os genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* estão diminuídos no grupo de pacientes com MF em relação ao grupo CTRL. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico Mann-Whitney.

Tabela 23 - Resultados das análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em leucócitos de pacientes com MF e expressão de genes pró e anti-apoptóticos.

GENE	<i>BAD</i>	<i>BAK</i>	<i>BCL-2</i>	<i>BCL-XL</i>
	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*	Valor de correlação (r) e valor de p*
<i>MST1</i>	r=0,09091 p=0,6874	r=0,3405 p=0,1210	r=0,4726 p=0,0263	r=0,5313 p=0,0109
<i>MST2</i>	r=-0,08413 p=0,7097	r=0,2422 p=0,2774	r=0,4308 p=0,0453	r=0,4195 p=0,0519
<i>SAVI</i>	r=-0,1101 p=0,6257	r=0,4229 p=0,0499	r=0,4184 p=0,0526	r=0,5551 p=0,0073
<i>LATS1</i>	r=0,07171 p=0,7511	r=0,1146 p=0,6115	r=0,002823 p=0,9901	r=-0,1033 p=0,6472
<i>LATS2</i>	r=-0,2264 p=0,3109	r=-0,01976 p=0,9304	r=0,2388 p=0,2844	r=0,03444 p=0,8791
<i>MOB1A</i>	r=-0,1417 p=0,5293	r=0,03766 p=0,0840	r=0,4907 p=0,0204	r=0,5415 p=0,0092
<i>MOB1B</i>	r=-0,1395 p=0,5359	r=0,2637 p=0,2357	r=0,3823 p=0,0791	r=0,4523 p=0,0346
<i>TAZ</i>	r=0,2106 p=0,3468	r=-0,1925 p=0,3906	r=-0,01412 p=0,0503	r=0,09317 p=0,6801
<i>AURKA</i>	r=0,1553 p=0,4902	r=0,02818 p=0,2040	r=0,3936 p=0,0700	r=0,4082 p=0,0593
<i>AURKB</i>	r=0,01299 p=0,9543	r=0,02428 p=0,9146	r=0,2084 p=0,3521	r=-0,4082 p=0,0593

Os dados significativos estão destacados em amarelo. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 21 - Correlação dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular com dados laboratoriais dos pacientes com MF. Houveram correlações positivas entre a expressão do gene *BAK* com *SAV1*, correlações positivas entre o gene *BCL-2* com os genes da via Hippo *MST1*, *MST2* e *MOB1A*, além de correlações positivas entre o gene *BCL-XL* e os genes da via Hippo *MST1*, *SAV1*, *MOB1A* e *MOB1B*. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). Teste estatístico correlação de Spearman.

7.7. Comparação entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular entre os grupos de pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primaria

Após a observação de diminuições significativas na expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular nos pacientes com NMP, foi realizada a comparação entre a expressão de tais genes entre os três diferentes grupos de doenças. Em células CD34⁺ provenientes da medula óssea, não foi observada diferenças nos níveis de expressão dos genes investigados (Figura 22).

Em leucócitos, foi observada menor expressão do gene *MST2* no grupo de pacientes com PV em relação aos pacientes com TE ($p=0,0034$) e MF ($p=0,0029$); maior expressão do gene *SAVI* pelos pacientes com PV em relação aos pacientes com TE ($p<0,0001$) e MF ($p<0,0001$); menor expressão do gene *TAZ* pelo grupo de pacientes com MF em relação aos grupos de PV ($p=0,0005$) e TE ($p<0,0001$); maior expressão do gene *AURKA* pelo grupo TE em relação ao grupo PV ($p=0,0051$) e maior expressão do gene *AURKB* pelo grupo MF em relação aos grupos TE ($p=0,0071$) e PV ($p=0,0002$) (Figura 23).

Figura 22 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular em células CD34⁺ de pacientes com PV, TE e MF. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico Mann-Whitney.

Figura 23 - Níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular nos leucócitos de pacientes com PV, TE e MF. O gene MST2 está menos expresso nos pacientes com PV em relação aos demais grupos de NMP; o gene SAV1 está mais expresso em pacientes com PV em relação aos demais grupos de NMP; o gene TAZ está diminuído nos pacientes com MF em relação aos demais grupos de

NMP; o gene AURKA está aumentado nos pacientes com TE em relação aos pacientes com PV e o gene AURKB está aumentado nos pacientes com MF em relação aos demais grupos de NMP. Os dados estão expressos em unidades relativas de expressão (URE). n= número de indivíduos no grupo. Teste estatístico Mann-Whitney.

7.8. Quantificação de citocinas e quimiocinas no plasma de pacientes com PV, TE e MF e indivíduos controles e correlação com dados laboratoriais

O presente estudo analisou as diferenças entre os perfis de citocinas em 11 pacientes com TE, 16 pacientes com MF, 20 pacientes com PV e 15 CTRL e a correlação com os dados laboratoriais dos pacientes. Também foram incluídos nessa parte do trabalho 34 indivíduos saudáveis que compuseram o grupo controle (CTRL). A idade mediana de pacientes com TE (med. = 54 anos) e CTRL (med. = 57,2 anos), bem como nos grupos de pacientes com PV (med. = 66 anos) e MF (med. = 64 anos). A distribuição de gênero no grupo CTRL foi de 42% do sexo masculino e 58% do sexo feminino, no grupo TE foi de 37% do sexo masculino e 63% do sexo feminino, no MF 75% do sexo masculino e 25% do sexo feminino e no grupo PV foi 55% do sexo masculino e 45% do sexo feminino. A mutação JAK2V617F foi detectada em 36%, 68% e 100% nos pacientes TE, MF e PV, respectivamente.

O perfil das citocinas plasmáticas dos pacientes com TE, MF e PV foi analisado pela determinação de 16 citocinas e quimiocinas (Figura 24). Em comparação com o grupo controle, os três grupos de pacientes com NMP apresentaram níveis aumentados de GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- α 2, MIP-1 α , IL-12p70 e TNF- α . Os pacientes com MF apresentaram aumento do nível de IL-17A em relação ao CTRL e níveis aumentados de IFN- γ , IL-12p70, IL-17A e IP-10 em comparação com TE e níveis aumentados de IL-12p70, IL-4 e GM -CSF em comparação com pacientes com PV. Os pacientes TE apresentaram níveis aumentados de RANTES em comparação com CTRL e PV, bem como aumento do nível de MIP-1 β em comparação com CTRL. Os pacientes com PV apresentaram aumento do nível de MIP-1 β em comparação com o CTRL. O nível de MCP-1 foi semelhante entre os quatro grupos estudados (Figura 24).

Figura 24 - Níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas em pacientes com neoplasias mieloproliferativas e indivíduos controles. Os níveis plasmáticos de GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e TNF- α foram mensurados em indivíduos saudáveis (CTRL; n=34) e pacientes com trombocitemia essencial (TE; n=11), mielofibrose primária (MF; n=16) e policitemia vera (PV; n=20). Teste estatístico OneWay ANOVA post Teste de Dunns.

7.9. Comparação entre os níveis de citocinas/quimiocinas nos pacientes com TE e MF conforme *status* mutacional

Considerando o papel fundamental da mutação JAK2V617F na fisiopatologia das NMP (THEM; KRALOVICS, 2013), foi avaliada se a presença da mutação está relacionada aos níveis alterados de citocinas/quimiocinas. Os pacientes MF com a mutação JAK2V617F apresentaram maior nível de IP-10 ($p = 0,0078$) em comparação com os pacientes com MF negativos para a mutação (Figura 25). Não houve associação entre o estado de mutação JAK2V617F e os níveis de citocinas/quimiocinas em pacientes TE.

Figura 25 - Influência do status da mutação JAK2V617F na produção de IP-10 em pacientes com MF. Teste estatístico Mann-Whitney.

7.10. Correlação entre os níveis plasmáticos das citocinas/quimiocinas analisadas nos grupos de pacientes

Para analisar a força da correlação entre os níveis das citocinas/quimiocinas estudadas, foram criadas redes de interação usando o teste de correlação de Spearman. A rede do grupo CTRL apresentou muitas conexões: correlações fortes entre IL-12p70, IFN- α 2, MIP-1 α e MIP-1 β ; correlações fracas entre IL-4, IL-6, IFN- α 2, IP-10, MIP-1 α e MIP-1 β ; e correlações negativas entre IL-10, IFN- γ e RANTES (Figura 26 A).

A rede de pacientes com TE apresentou muitas conexões fortes envolvendo GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- α 2, IL-1 β , TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10 e IFN- γ ; (Figura 26 B). Em contraste, a rede de pacientes do MF mostrou poucas conexões: fortes interações envolvendo IFN- γ , IL-6, IL-17A, GM-CSF, IL-6, IL-10 e IFN- α 2, uma fraca correlação entre MIP-1 α e IP-10 e uma correlação negativa entre GM-CSF e IP-10 (Figura 26 C). A rede de pacientes com PV apresentou

interações fortes envolvendo GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IFN- γ e IFN- α 2 (Figura 26 D).

Figura 26 - Os biomarcadores imunológicos apresentam interação sistêmica anormal em pacientes com neoplasias mieloproliferativas. A análise de rede mostra correlações significativas ($p < 0,05$) entre citocinas e quimiocinas em indivíduos saudáveis (CTRL, painel A) e em pacientes com

trombocitemia essencial (TE, painel B), mielofibrose primária (MF, painel C) e policitemia vera (PV; painel D). Os valores de "r" obtidos após a análise de correlação de Spearman foram utilizados para determinar a força de correlação: negativo ($r < 0$), fraco ($r \leq 0,35$), moderado ($0,36 \leq r \leq 0,67$) ou forte ($r \geq 0,68$).

7.11. Comparação do perfil inflamatório entre os pacientes com NMP e controles

Para melhor compreender e caracterizar a relação entre os diferentes grupos de pacientes com NMP e seus respectivos perfis imunes, a análise categórica foi realizada e os dados compilados em diagramas em escala preto e branco (Figura 27). Os resultados indicam que o grupo de controle é composto por baixos produtores de citocinas/quimiocinas, mas os três grupos de pacientes com NMP apresentaram o perfil oposto: alta frequência de altos produtores (representados pelos quadrados pretos) da maioria das citocinas/quimiocinas avaliadas: esse resultado foi mais evidente nos pacientes com MF.

Em seguida, os gráficos de radar foram plotados para comparar o perfil geral de citocinas/quimiocinas nos quatro grupos estudados (Figura 27). Uma citocina/quimiocina é considerada relevante no processo da doença, quando a frequência de altos produtores é superior a 50% (LUIZA-SILVA et al., 2011). No grupo CTRL, a frequência de produtores de citocinas/quimiocinas altas para todas as citocinas/quimiocinas avaliadas foi inferior a 50%. Em contraste, os grupos de pacientes com MF e PV apresentaram as maiores frequências de produtores de citocinas/quimiocinas altas em 16 e 14, respectivamente, das 16 citocinas/quimiocinas testadas. Os pacientes com TE apresentaram alta frequência de produtos elevados para 12 das 16 citocinas/quimiocinas analisadas.

Figura 27 - Os diagramas em preto e branco representam produtores altos (preto) e baixos (branco) de cada citocina/quimiocina (GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e TNF- α), nos quatro diferentes grupos. Cada coluna representa uma citocina/quimiocina, e cada bloco representa o padrão de produção de citocinas/quimiocinas de cada paciente. Os números abaixo de cada faixa representam a frequência de

produtores altos da citocina/quimiocina testada. B) Representação do perfil imune de CTRL e pacientes com TE, MF e PV. As tabelas de radares resumem a porcentagem de altos produtores de cada citocina/quimiocina nos grupos clínicos estudados.

7.12. Correlações entre os níveis de citocinas/quimiocinas e os parâmetros hematológicos dos pacientes com NMP

Foram avaliados se os níveis de citocinas/quimiocinas correlacionam-se com os parâmetros hematológicos nos três grupos de pacientes com NMP. Em pacientes com MF (Figura 28), GM-CSF e IL-12p70 correlacionaram-se positivamente com VCM; GM-CSF e IL-1 β correlacionaram-se positivamente com HCM, enquanto IP-10 e IFN- α 2 correlacionaram-se positivamente com a contagem de plaquetas. IP-10 correlacionou-se positivamente com o CHCM, IP-10, IL-17A, IL-5 e MIP-1 α foram correlacionados negativamente com os glóbulos vermelhos, enquanto o MIP-1 α foi correlacionado positivamente com a hemoglobina.

Em pacientes com PV (Figura 29), IP-10 correlacionou-se positivamente com RDW, enquanto a IL-5 correlacionou-se negativamente com RDW. A IL-5 também se correlacionou negativamente com GV, GB, Hb e CHCM. A IL-4 correlacionou-se negativamente com Hb e Ht, enquanto CHCM foram positivamente correlacionados com IFN- γ e MIP-1 β . Em pacientes com TE (Figura 30), a IL-5 correlacionou-se positivamente com VCM e HCM, enquanto TNF- α correlacionou-se positivamente com as plaquetas.

Figura 28 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e parâmetros hematológicos em pacientes com mielofibrose primária (n=16). A figura apresenta apenas as correlações significativas ($p < 0,05$) detectadas pelo teste de correlação de Spearman.

Figura 29 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e dados hematológicos em pacientes com policitemia vera (n=20). A figura apresenta apenas as correlações significativas ($p < 0,05$) detectadas pelo teste de correlação de Spearman.

Figura 30 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e dados hematológicos em pacientes com trombocitemia essencial (n=11). A figura apresenta apenas as correlações significativas ($p < 0,05$) detectadas pelo teste de correlação Spearman.

7.13. Correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e a expressão de genes da via Hippo em pacientes com NMP

Nos pacientes com mielofibrose primária, foram observadas correlações negativas entre os seguintes pares de citocinas e genes da via Hippo ou do ciclo celular: *MST2* e IL-12p70 ($p=0,0431$, $r=0,5308$); *AURKB* e IL-5 ($p=0,0314$, $r=0,5409$); *AURKB* e IL-12p70 ($p=0,0207$, $r=0,5773$); *LATS2* e MIP-1 α ($p=0,0431$, $r=0,5308$); *MOB1B* e MIP-1 α ($p=0,0322$, $r=0,5416$) e correlação positiva entre *LATS1* e TNF- α 2 ($p=0,0199$, $r=0,5817$) (Tabela 24 e figura 31).

Nos pacientes com policitemia vera foram detectadas correlações negativas entre os seguintes pares de citocinas e genes da via Hippo ou ciclo celular: *LATS2* e IL-1 β ($p=0,0422$, $r=0,4581$); *MST1* e IL-1 β ($p=0,0010$, $r=0,6785$); *MST1* e MIP-1 β ($p=0,0127$, $r=0,5461$); *MST1* e RANTES ($p=0,0234$, $r=0,5041$); *MST2* e IFN- γ ($p=0,0100$, $r=0,5613$); *MST2* e IL-1 β ($p=0,0002$, $r=0,7319$); *MST2* e IL-5 ($p=0,0033$, $r=0,6237$); *MST2* e IL-6 ($p=0,0251$, $r=0,4989$); *MST2* e MIP-1 β ($p=0,0163$, $r=0,5295$); *SAV1* e IL-1 β ($p=0,0375$, $r=0,4678$); *MOB1B* e IL-10 ($p=0,0213$, $r=0,5111$); *TAZ* e IL-10 ($p=0,0213$, $r=0,5111$); *AURKA* e IFN- α 2 ($p=0,0367$, $r=0,4695$); *AURKA* e IL-1 β ($p=0,0235$, $r=0,5039$); *AURKA* e IL-4 ($p=0,0237$, $r=0,5034$); *AURKA* e IL-5 ($p=0,0471$, $r=0,4490$); *AURKA* e IL-6 ($p=0,0273$, $r=0,4929$); *AURKB* e RANTES ($p=0,0077$, $r=0,5771$) (Tabela 25 e figura 32).

Nos pacientes com trombocitemia essencial não foram detectadas correlações entre os níveis de citocinas e os níveis de expressão dos genes da via Hippo ou ciclo celular (Tabela 26).

Tabela 24 - Correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e os níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular de leucócitos de pacientes com MF.

	<i>MST1</i>	<i>MST2</i>	<i>SAVI</i>	<i>LATS1</i>	<i>LATS2</i>	<i>MOB1A</i>	<i>MOB1B</i>	<i>TAZ</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>
GM-CSF	p=0,3333 r=-0,2587	p=0,1644 r=0,3651	p=0,2372 r=-0,3134	p=0,6350 r=0,1286	p=0,6389 r=0,1271	p=0,2168 r=-0,3267	p=0,4519 r=-0,2025	p=0,2146 r=-0,3282	p=0,1935 r=-0,3429	p=0,2841 r=-0,28537
IFN- α 2	p=0,3085 r=-0,2718	p=0,4063 r=-0,2230	p=0,7277 r=-0,09454	p=0,9135 r=0,02954	p=0,7774 r=-0,07681	p=0,5042 r=-0,1802	p=0,7154 r=0,09897	p=0,7400 r=-0,09010	p=0,5700 r=-0,1536	p=0,0928 r=-0,4343
IFN- γ	p=0,5204 r=0,1735	p=0,7452 r=0,08824	p=0,6407 r=-0,1265	p=0,5133 r=0,1765	p=0,2493 r=-0,3059	p=0,8456 r=-0,05294	p=0,2739 r=0,2912	p=0,3504 r=-0,2500	p=0,4645 r=0,1871	p=0,7288 r=-0,09412
IL-10	p=0,8541 r=0,0500	p=0,5643 r=-0,1559	p=0,6251 r=-0,1324	p=0,4921 r=0,1853	p=0,4246 r=-0,2147	p=0,6564 r=-0,1206	p=0,9828 r=-0,0476	p=0,3274 r=-0,2618	p=0,5643 r=-0,1559	p=0,5133 r=-0,1765
IL-12p70	p=0,2509 r=-0,3049	p=0,0216 r=-0,5685	p=0,0939 r=-0,4330	p=0,3239 r=0,2636	p=0,5415 r=0,1649	p=0,1350 r=-0,3903	p=0,9525 r=0,01620	p=0,2533 r=-0,3034	p=0,1383 r=-0,3873	p=0,0192 r=-0,5773
IL-17A	p=0,8411 r=0,05449	p=0,7822 r=0,07511	p=0,8496 r=0,005155	p=0,3615 r=0,2445	p=0,4672 r=0,1959	p=0,6285 r=0,1311	p=0,2321 r=0,3166	p=0,5600 r=0,1576	p=0,1334 r=0,3918	p=0,7162 r=0,09867
IL-1 β	p=0,2441 r=-0,03091	p=0,1386 r=-0,3870	p=0,0675 r=-0,4680	p=0,3299 r=-0,2605	p=0,3986 r=-0,2266	p=0,3442 r=-0,2531	p=0,0685 r=0,4665	p=0,5790 r=0,1501	p=0,0834 r=-0,4459	p=0,2489 r=-0,3061
IL-4	p=0,5117 r=-0,1771	p=0,8069 r=-0,06642	p=0,5778 r=-0,1506	p=0,8792 r=-0,04133	p=0,9222 r=-0,2657	p=0,3200 r=-0,2657	p=0,3941 r=0,2288	p=0,3398 r=0,2554	p=0,2746 r=0,2908	p=0,8196 r=-0,06199
IL-5	p=0,1108 r=-0,04141	p=0,2117 r=-0,3301	p=0,1514 r=-0,3758	p=0,5936 r=-0,1444	p=0,8453 r=0,05306	p=0,3042 r=-0,2741	p=0,5860 r=0,1474	p=0,1080 r=-0,4171	p=0,8030 r=-0,06780	p=0,0305 r=0,5409
IL-6	p=0,9611 r=0,01326	p=0,5231 r=0,1724	p=0,8623 r=0,04716	p=0,6997 r=0,1046	p=0,5412 r=0,1651	p=0,8453 r=0,05306	p=0,7571 r=0,08401	p=0,4533 r=-0,2019	p=0,9223 r=-0,02653	p=0,3179 r=-0,2668
IP-10	p=0,1032 r=0,04556	p=0,6562 r=0,1207	p=0,6681 r=0,1163	p=0,7492 r=-0,08683	p=0,1402 r=0,3856	p=0,2418 r=0,3105	p=0,3327 r=0,2590	p=0,2969 r=-0,2781	p=0,7482 r=0,08683	p=0,9957 r=-0,00147
MCP-1	p=0,5643 r=0,01559	p=0,2688 r=0,2941	p=0,6564 r=0,1206	p=0,5349 r=0,1676	p=0,3622 r=0,02441	p=0,5643 r=0,1559	p=0,4991 r=0,1824	p=0,9569 r=-0,01471	p=0,8626 r=0,04706	p=0,7867 r=-0,07353
MIP-1 α	p=0,3893 r=0,2311	p=0,3023 r=0,2752	p=0,8668 r=-0,04562	p=0,9138 r=-0,02943	p=0,0267 r=0,5519	p=0,2146 r=0,3282	p=0,0303 r=0,5416	p=0,1058 r=-0,4194	p=0,1816 r=0,3517	p=0,9181 r=-0,02796
MIP-1 β	p=0,6091 r=0,1384	p=0,8200 r=0,06186	p=0,8031 r=-0,06775	p=0,7822 r=-0,07511	p=0,6559 r=-0,1208	p=0,5452 r=-0,1635	p=0,8539 r=0,05007	p=0,9267 r=0,02504	p=0,8369 r=-0,05596	p=0,6718 r=-0,1149
RANTES	p=0,1013 r=-0,04245	p=0,7904 r=0,07222	p=0,5597 r=-0,1577	p=0,6243 r=0,1326	p=0,8922 r=-0,03685	p=0,3979 r=-0,2270	p=0,4333 r=0,2108	p=0,9741 r=0,008843	p=0,4235 r=0,2152	p=0,5597 r=0,1577
TNF- α	p=0,2939 r=0,02794	p=0,4914 r=0,1856	p=0,5787 r=-0,1502	p=0,0181 r=0,5817	p=0,4503 r=0,2032	p=0,6838 r=0,1105	p=0,7284 r=0,09426	p=0,8158 r=0,06333	p=0,3615 r=-0,2445	p=0,5020 r=0,01811

As correlações significativas estão destacadas em amarelo. Teste de correlação de Spearman.

Figura 31 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e níveis de expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em pacientes com mielofibrose primária (n=16). A figura apresenta apenas as correlações significativas ($p < 0,05$) detectadas pelo teste de correlação de Spearman.

Tabela 25: Correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e dos níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular de leucócitos de pacientes com PV.

	<i>MST1</i>	<i>MST2</i>	<i>SAVI</i>	<i>LATS1</i>	<i>LATS2</i>	<i>MOB1A</i>	<i>MOB1B</i>	<i>TAZ</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>
GM-CSF	p=0,6330 r=-0,1106	p=0,0921 r=-0,3867	p=0,1935 r=-0,2955	p=0,1399 r=-0,3332	p=0,5509 r=-0,1380	p=0,2811 r=-0,2467	p=0,2890 r=-0,2428	p=0,2507 r=-0,2623	p=0,0677 r=-0,4061	p=0,5099 r=-0,1523
IFN- α 2	p=0,4572 r=-0,1715	p=0,0714 r=-0,4116	p=0,5365 r=-0,1430	p=0,2690 r=-0,2529	p=0,4283 r=-0,1826	p=0,3373 r=-0,2203	p=0,3243 r=-0,2261	p=0,2819 r=-0,2463	p=0,0336 r=-0,4652	p=0,3923 r=-0,1969
IFN- γ	p=0,3243 r=0,2261	p=0,0100 r=-0,5613	p=0,5383 r=-0,1423	p=0,9532 r=-0,01365	p=0,6296 r=-0,1118	p=0,9576 r=0,01235	p=0,9154 r=0,02469	p=0,3506 r=-0,2144	p=0,1623 r=-0,3164	p=0,37597 r=-0,2105
IL-10	p=0,4834 r=0,1618	p=0,5139 r=-0,1551	p=0,2977 r=-0,2385	p=0,1061 r=-0,3627	p=0,1075 r=-0,2614	p=0,1506 r=-0,3250	p=0,0224 r=-0,4953	p=0,0137 r=-0,5291	p=0,1356 r=-0,3367	p=0,4181 r=-0,1865
IL-12p70	p=0,7687 r=-0,06827	p=0,4081 r=-0,1958	p=0,5343 r=-0,1437	p=0,5494 r=-0,1385	p=0,9487 r=-0,01495	p=0,8910 r=-0,03186	p=0,5820 r=-0,1274	p=0,3058 r=-0,2347	p=0,2962 r=-0,2393	p=0,7452 r=0,07542
IL-17A	p=0,9710 r=-0,008453	p=0,2701 r=-0,2590	p=0,6720 r=0,09818	p=0,7859 r=-0,06307	p=0,6761 r=-0,09688	p=0,8689 r=-0,03836	p=0,6927 r=0,09168	p=0,3794 r=-0,2022	p=0,2230 r=-0,2776	p=0,5898 r=-0,1248
IL-1 β	p=0,0009 r=-0,6690	p=0,0002 r=-0,7319	p=0,0336 r=-0,4651	p=0,1843 r=-0,3014	p=0,0426 r=-0,4462	p=0,0631 r=-0,4125	p=0,0517 r=-0,4300	p=0,0770 r=-0,3943	p=0,0177 r=-0,5119	p=0,0509 r=-0,4313
IL-4	p=0,4724 r=-0,1657	p=0,0835 r=-0,3965	p=0,6702 r=-0,09877	p=0,4316 r=-0,1813	p=0,3006 r=-0,2372	p=0,3020 r=-0,2365	p=0,1241 r=-0,3463	p=0,2780 r=-0,2482	p=0,0205 r=-0,5016	p=0,4659 r=-0,1683
IL-5	p=0,2343 r=-0,2712	p=0,0033 r=-0,6237	p=0,2560 r=-0,2595	p=0,8490 r=-0,04423	p=0,8119 r=-0,05528	p=0,8032 r=-0,05789	p=0,8843 r=-0,03382	p=0,9353 r=0,01886	p=0,1329 r=-0,3389	p=0,5799 r=-0,1281
IL-6	p=0,4452 r=-0,1761	p=0,0251 r=-0,4989	p=0,9621 r=-0,01105	p=0,8955 r=0,03054	p=0,6599 r=-0,1020	p=0,6825 r=-0,09487	p=0,8273 r=-0,05068	p=0,6477 r=-0,1059	p=0,0276 r=-0,4802	p=0,5365 r=-0,1430
IP-10	p=0,4152 r=-0,1877	p=0,9348 r=-0,01956	p=0,7840 r=-0,06366	p=0,6377 r=0,1091	p=0,2157 r=-0,2819	p=0,4054 r=-0,1916	p=0,5107 r=-0,1520	p=0,5107 r=-0,1520	p=0,9443 r=0,01624	p=0,7055 r=-0,08769
MCP-1	p=0,3659 r=-0,2079	p=0,3306 r=-0,2294	p=0,6197 r=0,1150	p=0,3957 r=-0,1955	p=0,0743 r=-0,3975	p=0,1457 r=-0,3287	p=0,1774 r=-0,3059	p=0,2038 r=-0,2891	p=0,3861 r=-0,1994	p=0,1466 r=-0,3280
MIP-1 α	p=0,9265 r=-0,02145	p=0,2129 r=-0,2912	p=0,1144 r=-0,3549	p=0,1316 r=-0,3399	p=0,8733 r=-0,03505	p=0,5997 r=0,1215	p=0,3906 r=-0,1976	p=0,8011 r=0,05850	p=0,8229 r=-0,05200	p=0,7602 r=-0,07085
MIP-1 β	p=0,0565 r=-0,4224	p=0,0163 r=-0,5295	p=0,7074 r=-0,08707	p=0,7200 r=-0,08317	p=0,2058 r=-0,2878	p=0,2806 r=-0,2469	p=0,7689 r=-0,6823	p=0,5649 r=-0,1332	p=0,6846 r=-0,09422	p=0,1481 r=-0,3268
RANTES	p=0,0102 r=-0,5473	p=0,1202 r=-0,3589	p=0,4382 r=-0,1787	p=0,3595 r=-0,2106	p=0,0448 r=-0,4420	p=0,0903 r=-0,3789	p=0,9087 r=-0,02665	p=0,0951 r=-0,3737	p=0,1364 r=-0,3360	p=0,0045 r=-0,5947
TNF- α	p=0,7990 r=-0,05913	p=0,4676 r=-0,1723	p=0,3158 r=0,2300	p=0,9755 r=-0,007148	p=0,2155 r=-0,2820	p=0,2767 r=-0,2489	p=0,6887 r=0,09292	p=0,3102 r=-0,2326	p=0,5591 r=-0,1352	p=0,2005 r=-0,2911

As correlações significativas estão destacadas em amarelo. Teste de correlação de Spearman.

Figura 32 - Correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas e os níveis expressão dos genes da via Hippo e do ciclo celular em pacientes com policitemia vera (n=20). A figura apresenta apenas as correlações significativas ($p < 0,05$) detectadas pelo teste de correlação de Spearman.

Tabela 26 - Correlação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e níveis de expressão dos genes da via Hippo e ciclo celular de leucócitos de pacientes com TE.

	<i>MST1</i>	<i>MST2</i>	<i>SAVI</i>	<i>LATS1</i>	<i>LATS2</i>	<i>MOB1A</i>	<i>MOB1B</i>	<i>TAZ</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>
GM-CSF	p=0,7890 r=-0,09154	p=0,6186 r=0,1693	p=0,8620 r=0,05950	p=0,9787 r=0,009154	p=0,2945 r=-0,3478	p=0,8726 r=-0,05492	p=0,3978 r=-0,2838	p=0,6773 r=-0,1419	p=0,5712 r=-0,1922	p=0,8937 r=-0,04577
IFN- α 2	p=0,7086 r=-0,1276	p=0,6493 r=0,1549	p=0,5094 r=-0,2232	p=0,3921 r=0,2870	p=0,4659 r=-0,2460	p=0,7388 r=-0,1139	p=0,2275 r=-0,3964	p=0,9894 r=-0,004556	p=0,8209 r=-0,07745	p=0,8106 r=0,08200
IFN- γ	p=0,8834 r=0,05023	p=0,3832 r=0,2922	p=0,3026 r=-0,3425	p=0,8414 r=-0,06849	p=0,7791 r=0,09589	p=0,6979 r=0,1324	p=0,9151 r=-0,03653	p=0,4231 r=-0,2694	p=0,6004 r=-0,1781	p=0,9045 r=0,04110
IL-10	p=0,1697 r=0,4455	p=0,7904 r=-0,09091	p=0,2981 r=-0,3445	p=0,3403 r=-0,3182	p=0,4841 r=-0,2364	p=0,9577 r=0,01818	p=0,2466 r=-0,3818	p=0,2006 r=-0,4182	p=0,2589 r=-0,3727	p=0,4334 r=-0,2636
IL-12p70	p=0,2037 r=-0,4155	p=0,1000 r=0,0000	p=0,3910 r=-0,2877	p=0,5353 r=-0,2100	p=0,2629 r=-0,3699	p=0,8414 r=-0,06849	p=0,2037 r=-0,4155	p=0,7180 r=0,1233	p=0,3165 r=-0,3333	p=0,7180 r=-0,1233
IL-17A	p=0,5454 r=0,2050	p=0,0674 r=0,5695	p=0,8837 r=0,05011	p=0,5730 r=0,1913	p=0,5454 r=-0,2050	p=0,1888 r=0,4282	p=0,6396 r=0,1595	p=0,2969 r=0,3462	p=0,3689 r=-0,3007	p=0,3766 r=0,2961
IL-1 β	p=0,6107 r=-0,1731	p=0,4574 r=0,2506	p=0,7287 r=-0,1185	p=0,6590 r=-0,1503	p=0,4659 r=0,2460	p=0,2641 r=-0,3690	p=0,5363 r=0,2096	p=0,3614 r=0,3052	p=0,7796 r=0,09567	p=0,7186 r=-0,1230
IL-4	p=0,4197 r=-0,2713	p=0,9252 r=-0,03219	p=0,3720 r=-0,2989	p=0,5324 r=-0,2115	p=0,8614 r=-0,05977	p=0,9145 r=-0,03678	p=0,7776 r=-0,09656	p=0,6267 r=0,1655	p=0,5883 r=-0,1839	p=0,2003 r=-0,4184
IL-5	p=0,6082 r=-0,1743	p=0,5153 r=-0,2202	p=0,8302 r=0,07340	p=0,5334 r=-0,2110	p=0,2800 r=-0,3578	p=0,1960 r=-0,4220	p=0,1854 r=-0,4312	p=0,0920 r=-0,5321	p=0,4627 r=-0,2477	p=0,1854 r=-0,4312
IL-6	p=0,7388 r=-0,1139	p=0,7388 r=0,1139	p=0,3037 r=-0,3417	p=0,5272 r=-0,2141	p=0,8209 r=-0,07745	p=0,6493 r=0,1549	p=0,7899 r=-0,09112	p=0,1163 r=0,5011	p=0,5730 r=-0,6590	p=0,5094 r=-0,2232
IP-10	p=0,8942 r=-0,04556	p=0,2902 r=0,3508	p=0,9153 r=-0,03645	p=0,4242 r=0,2688	p=0,9576 r=-0,01822	p=0,2393 r=0,3872	p=0,5545 r=0,2005	p=0,2160 r=0,4055	p=0,6590 r=-0,1503	p=0,9258 r=-0,003189
MCP-1	p=0,8418 r=-0,06834	p=0,9576 r=0,01822	p=0,9894 r=-0,004556	p=0,3921 r=0,2870	p=0,8209 r=-0,07745	p=0,9470 r=-0,02278	p=0,9788 r=0,009112	p=0,8732 r=0,5467	p=0,7287 r=-0,1185	p=0,4659 r=-0,2460
MIP-1 α	p=0,4171 r=0,2727	p=0,1097 r=0,5091	p=0,9788 r=-0,009091	p=0,4334 r=0,2636	p=0,5926 r=0,1818	p=0,2115 r=0,4091	p=0,3550 r=-0,3091	p=0,0604 r=0,5818	p=0,8110 r=0,08182	p=0,171 r=0,2727
MIP-1 β	p=0,9153 r=-0,03645	p=0,4918 r=0,2323	p=0,7694 r=0,1002	p=0,5183 r=0,2187	p=0,6590 r=0,1503	p=0,4406 r=0,2597	p=0,4080 r=0,2779	p=0,9470 r=0,02278	p=0,6012 r=0,1777	p=0,9252 r=-0,03189
RANTES	p=0,6299 r=-0,1640	p=0,3465 r=0,3144	p=0,8837 r=-0,05011	p=0,6203 r=0,1686	p=0,01454 r=-0,692	p=0,2578 r=0,3736	p=0,3391 r=0,3189	p=0,4659 r=0,2460	p=0,1591 r=0,4556	p=0,5918 r=0,1822
TNF- α	p=0,8317 r=0,07273	p=0,7495 r=0,1091	p=0,4334 r=-0,2636	p=0,9366 r=0,02727	p=1,0000 r=0,0000	p=0,8110 r=0,08182	p=0,8525 r=0,06364	p=0,1173 r=0,5000	p=0,6307 r=-0,1636	p=0,9788 r=0,009091

Teste de correlação de Spearman.

8. Discussão

A via de sinalização celular Hippo emergiu como uma rede de sinalização complexa implicada na compreensão dos mecanismos moleculares do desenvolvimento e progressão dos cânceres (HALDER; JOHNSON, 2011). Essa via, quando ativada, permite que YAP/TAZ migrem para o núcleo da célula, transduzindo sinais e regulando a expressão gênica (BADOUEL; GARG; MCNEILL, 2009).

A maioria dos componentes da via Hippo foi descoberta por meio da triagem genética em modelo mosaico em busca de genes supressores de tumor em *Drosophila melanogaster* (BADOUEL; GARG; MCNEILL, 2009; HARVEY; TAPON, 2007; WU et al., 2003). Em 1982 Gateff catalogou 25 genes, cuja perda de função devido à mutação em homozigose induzia tumores no cérebro, no sistema hematopoético ou nos discos imaginários de *Drosophila melanogaster*. Esses tumores apresentaram morfologia celular alterada, proliferação exacerbada, diferenciação prejudicada e alto potencial invasivo (GATEFF, 1982).

Em mamíferos, a via Hippo contribui para a fisiopatologia de diversas desordens clínicas, incluindo a tumorigênese em cânceres de mama (TAKAHASHI et al., 2005), pulmonares (SASAKI et al., 2007), colorretal (KOSAKA et al., 2007), carcinoma de célula escamosa da língua (WEI et al., 2013), papilares da tireóide (DE CRISTOFARO et al., 2011a), ovário (HALL et al., 2010), gliomas (JI et al., 2012) e neoplasias hematológicas como a leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda, linfoma de células do manto, mieloma múltiplo e síndromes mielodisplásicas (DHYANI et al., 2012; GHOLAMI et al., 2014; HARTMANN et al., 2010; JIMÉNEZ-VELASCO et al., 2005; MACHADO-NETO et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa descreveu o aumento da expressão de genes da via Hippo como *LATS1*, *LATS2* e *TAZ*, bem como de *AURKB* do ciclo celular em células mononucleares de pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) (MARSOLA et al., 2018). Nas três NMP Ph-negativas aqui estudadas observamos também a desregulação dos genes via Hippo, onde alguns genes supressores de tumor estão menos expressos tanto em leucócitos totais do sangue periférico quanto em precursores CD34⁺ da medula óssea, sugerindo que nas NMP Ph-negativas o perfil de regulação da expressão gênica da via Hippo é diferente daquele apresentado pelos pacientes com LMC. Assim sendo, provavelmente a participação dos membros da via de sinalização Hippo na fisiopatologia das NMP Ph-negativas deve ser distinta da observada nos pacientes com LMC.

Um estudo *in vitro* usando células da linhagem HL-60, linhagem originada de paciente com LMA M3, mostrou que a inibição de *YAP* por shRNA (do inglês *short hairpin RNA*) foi

capaz de induzir a parada do ciclo celular em fase G0/G1 e aumentar a apoptose celular. A apoptose e parada do ciclo celular, na linhagem celular HL-60, foi acompanhada pelo aumento dos níveis de expressão da proteína pró-apoptótica BAX e da molécula PARP clivada e pela diminuição dos níveis de PARP total, proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 e Survivina e da proteína reguladora do ciclo celular Ciclina D1 (CHEN et al., 2017). Esse resultado sugere, portanto, que a desregulação da via Hippo está associada com a alteração do processo de regulação da apoptose e proliferação celular em LMA.

Em outra publicação da literatura, a linhagem celular K562 Bcr-Abl⁺, transduzida com shRNA inibidor de *YAP* ou tratada com o inibidor farmacológico de *YAP* (veteporfina) apresentou diminuição da proliferação e aumento da apoptose celular. Adicionalmente, o uso da veteporfina (VP) foi capaz de aumentar a eficácia do tratamento com mesilato de imatinibe (MI), após a observação de que camundongos NOD-SCID injetados intravenosamente com células K562 e tratados com tampão salina-fosfato (PBS) apresentaram maiores contagens de glóbulos brancos do que os camundongos tratados com MI, VP ou com a combinação de VP e MI. Além disso, os camundongos no grupo controle (PBS) apresentam esplenomegalia e hepatomegalia mais graves em comparação com os grupos MI e VP e a combinação de VP e MI (LI et al., 2016a).

Em nosso estudo, nas amostras de medula óssea e sangue periférico avaliadas, não foi possível detectar a expressão gênica ou proteica de *YAP1*, porém a detecção da expressão gênica de seu ortólogo *TAZ* estava diminuída em células CD34⁺ de pacientes com PV e TE e leucócitos de pacientes com MF.

A elevada expressão do mRNA de *TAZ* tem sido relacionada ao pior prognóstico e a características clínico-patológicas desfavoráveis como o maior tamanho do tumor e estágio clínico tardios no carcinoma de células escamosas de língua (WEI et al., 2013). No carcinoma papilar de tireoide foi observado que os níveis aumentados da proteína *TAZ* estão associados ao crescimento tumoral (DE CRISTOFARO et al., 2011b). Donato e colaboradores, usando modelo animal deficiente de *YAP/TAZ*, mostraram que a ausência da expressão desses genes não interfere na hematopoese, uma vez que a ausência desses genes não alterou, no animal, a produção ou número de células sanguíneas periféricas e precursoras (DONATO et al., 2018).

Pelo exposto na literatura, os nossos resultados são contraditórios aos verificados em tumores sólidos, já que há diminuição dos níveis de expressão de *TAZ* nos pacientes com NMP. Cabe aqui salientar, que não foi avaliado em nosso estudo o grau de ativação ou fosforilação de *YAP* e *TAZ*.

A ativação das proteínas YAP/TAZ resulta no estímulo dos seus reguladores negativos LATS1/2, construindo um ciclo de retroalimentação negativa da via Hippo (MOROISHI et al., 2015). YAP/TAZ, em conjunto com o fator de transcrição TEAD, induz diretamente a expressão de *LATS2*, além de estimular a atividade quinase de LATS1/2 por meio da indução de neurofibromina 2 (NF2), de modo que esse ciclo de retroalimentação mediado pelo LATS fornece um mecanismo eficiente para estabelecer a homeostase da regulação de YAP/TAZ (MOROISHI et al., 2015), portanto, a ativação de YAP/TAZ é ainda mais importante do que seus níveis de expressão.

A atividade de YAP/TAZ também pode ser regulada por Rho-GTPases. Mecanicamente, LATS1/2 apresentam atividade quinase diminuída sobre a inibição de Rho que culmina na ativação da cascata de transdução Rho-GTPases ativadas por receptores acoplados às proteínas G (GPCR - do inglês *G protein-coupled receptors*); no entanto, o envolvimento funcional do LATS1/2 nos efeitos biológicos da sinalização GPCR/Rho e a própria fosforilação YAP/TAZ é ainda controverso (FENG et al., 2014).

A ideia da participação de YAP/TAZ no desenvolvimento de cânceres humano sugere que ambos são o ponto final comum de várias vias de sinalização envolvidas na transformação celular. Entretanto, Harvey e colaboradores sugerem que a ativação de YAP/TAZ não pode ser explicada unicamente por mutações nos componentes da via Hippo, sugerindo, portanto, que outros fatores estão atuando sobre a ativação de YAP/TAZ (HARVEY; ZHANG; THOMAS, 2013).

O papel da via Hippo no desenvolvimento e progressão tumoral é considerado ambíguo, ou seja, o mesmo membro da via pode atuar como supressor de tumor ou oncogene em desordens clínicas distintas. Por exemplo, a baixa expressão de *LATS2* tanto em leucemia/linfoma de células T adultas como também na leucemia de células *natural killer*, resulta em diminuição da expressão de genes pró-apoptóticos e resistência das células leucêmicas à quimioterapia (KAWAHARA et al., 2008), enquanto que na leucemia mieloide aguda observa-se que seria o aumento da expressão de *LATS2* responsável pela leucemogênese (GHOLAMI et al., 2014; OGAWA et al., 2015).

O *LATS2* é um gene supressor de tumor com três funções principais: 1) regular negativamente o ciclo celular controlando a transição G1-S e/ou G2-M; 2) induzir a apoptose por meio da regulação negativa das proteínas anti-apoptóticas, BCL-2 e BCL-X_L e 3) atuar nos processos que governam a duplicação do centrôssoma, manutenção da fidelidade mitótica e estabilidade genômica (KE et al., 2004; LI et al., 2003; MCPHERSON et al., 2004, p. 2).

Nossos dados mostram a diminuição de *LATS2* no sangue periférico de pacientes com PV e TE. Nota-se ainda a correlação negativa entre a expressão do gene pró-apoptótico *BAD* e outros genes membros da via Hippo: *LATS1*, *MST1*, *MST2*, *MOB1A*, *MOB1B* e *TAZ*. Em PV, esse dado nos permite especular que a redução de expressão do *TAZ* contribui para o fenótipo de resistência das células do sangue periférico à apoptose celular, observado pela correlação negativa entre a expressão do gene pró-apoptótico *BAD* e a expressão do gene *TAZ* nesses pacientes. Além da correlação, existe uma associação entre a baixa expressão dos genes da via Hippo e a diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* e a alta expressão dos genes anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-X_L*.

Na TE, observou-se também menores níveis de expressão dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* e níveis aumentados dos genes anti-apoptóticos *BCL-2* e *BCL-X_L*, de modo que a expressão do gene pró-apoptótico *BAD* se correlacionou negativamente com a expressão dos genes *MST1*, *MOB1A*, *MOB1B* e com as *AURKA* e *AURKB*.

Os pacientes com MF apresentaram um perfil de expressão de genes da via Hippo e apoptóticos, além de um perfil de produção de citocinas diferente da PV e TE que é evidente pela menor expressão de *SAVI*, *TAZ* e *AURKB*, diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK*, além de correlações positivas entre genes anti-apoptóticos *BCL-2* com os genes *MST1*, *MST2* e *MOB1A*, bem como do gene *BCL-X_L* com os genes *MST1*, *SAVI*, *MOB1A* e *MOB1B* e também maior produção de citocinas pró-inflamatórias, tais achados provavelmente têm associação com o pior prognóstico e menor sobrevida observados nessa NMP.

Outra característica marcante observada foi a correlação entre a expressão dos genes da via Hippo com alguns dos parâmetros hematológicos analisados nos pacientes com NMP. Na PV, por exemplo, a expressão do gene *LATS2* está negativamente correlacionada ao número de plaquetas e na literatura já foi descrito que a depleção de *LATS1/2* resulta no aumento de megacariócitos CD41⁺ com biogênese plaquetária prejudicada, sugerindo que a via de sinalização Hippo desempenha um papel crucial na diferenciação celular e trombopoese humana (LORTHONGPANICH et al., 2017), portanto, nosso achado sugere que a diminuição de *LATS2* e sua correlação negativa com a contagem plaquetária na PV pode estar associada ao aumento do número de plaquetas nesses pacientes.

Nos pacientes com MF as correlações negativas com a expressão dos genes *MST1*, *MOB1A*, *MOB1B* e *AURKB* envolvem o número de glóbulos brancos, contagem de plaquetas, VCM, HCM e CHCM, entretanto, nos pacientes com TE não houve correlação significativa entre a expressão dos genes da via Hippo e os parâmetros hematológicos analisados,

sugerindo mais uma vez que a via Hippo pode ter funções e contribuição distintas na fisiopatologia das três diferentes entidades clínicas.

A diminuição da expressão de *SAVI* observada nos pacientes com MF se correlacionou de maneira positiva à expressão do gene anti-apoptótico *BCL-XL* e ao gene pró-apoptótico *BAK* nos pacientes com MF. No processo de desenvolvimento do câncer colorretal humano, *SAVI* é considerado um supressor tumoral, pois o aumento de sua expressão inibe a via de sinalização YAP-Akt-mTOR, uma vez que o silenciamento do *SAVI* promove o crescimento de células cancerosas colorretais *in vitro* e *in vivo*, por meio dessa via de sinalização (JIANG et al., 2017).

A expressão diminuída de MST1/MST2 em pacientes com PV e TE foi também constatada em nosso estudo. Os genes *MST1/2* estão associados à fisiopatologia de várias doenças, incluindo o câncer relacionado à inflamação (oncoinflamação) e aterosclerose (QIN et al., 2013; ZHOU; LI; WANG, 2017).

Estudos relevaram que as moléculas *MST1/2* medeiam a resposta imune inata contra bactérias e vírus, atuando especialmente na fagocitose de macrófagos, bem como na liberação e produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO) (KIM et al., 2012).

O MST1 regula as respostas inflamatórias mediadas por receptores do tipo Toll 3/4/9 (TLR - do inglês *Toll like receptors*) em macrófagos conferindo a essas células um papel protetor contra o carcinoma hepatocelular associado à inflamação crônica, visto que a deleção de *MST1* nos macrófagos aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por TLR4/9 e resultou em inflamação crônica e fibrose hepática (LI et al., 2015b).

Embora a ativação da via TLR aumente a produção de proteínas antimicrobianas por meio da sinalização canônica da via Hippo, a via não canônica para MST1/2 tem sido descrita por contribuir para a patogênese do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A infecção por Mtb em células murinas desencadeia resposta imune via TLR2 por meio de quinases associadas ao receptor-1 da interleucina 1/4 (IRAK1/4) que, por sua vez, ativam o MST1/2 que estimula o fator regulatório de interferon 3 (IRF3 - do inglês *Interferon regulatory factor 3*) e estimula a produção da quimiocina CXCL1/2 e peptídeos antimicrobianos como a β -defensina (BORO; SINGH; BALAJI, 2016).

A ausência de *MST1*, em camundongos, aumenta o risco de desenvolvimento de linfoma e a susceptibilidade ao desenvolvimento da leucemia linfoblástica aguda de células T induzida pela exposição a mutagênicos devido à instabilidade cromossômica (KIM et al., 2012). Antes da transformação neoplásica, os timócitos normais de camundongos deficientes de *MST1* (*MST1*^{-/-}) não apresentaram alterações na proliferação ou apoptose *in vitro* e *in vivo*,

mas exibiram níveis elevados de anormalidades mitóticas e aneuploidia, condições conhecidas por promoverem a tumorigênese (KIM et al., 2012).

Xie e colaboradores associaram a baixa expressão de *MST1* à patogênese e ao pior prognóstico dos pacientes com leucemia mieloide aguda, após observar que em comparação aos controles, o nível de expressão de *MST1* em pacientes recém-diagnosticados com LMA diminuiu significativamente, mas aumentou significativamente em pacientes com leucemia aguda em remissão completa (XIE et al., 2012).

MST1/2 tem também papel importante na modulação da resposta imune adquirida, pois parecem atuar na regulação da adesão das células T, na migração, localização, maturação e funções das células T-reg (QIN et al., 2013; ZHOU; LI; WANG, 2017).

Foi descrito ainda que a diminuição da função de *MST1* em pacientes portadores de mutações no gene acarreta a síndrome de imunodeficiência primária caracterizada por linfopenia de células TCD4+ e TCD8+, bem como a neutropenia. Esses pacientes apresentam infecções bacterianas recorrentes, infecções virais e manifestações autoimunes. (ABDOLLAHPOUR et al., 2012; CREQUER et al., 2012; NEHME et al., 2012).

Curiosamente, esses processos não dependem da via canônica, mas sim da via não canônica de sinalização Hippo, que pode ser regulada por diversos fatores como os hormônios insulina e estrogênio, além do compartilhamento de efetores comuns com outras vias de sinalização como Ras/ERK, AKT, WNT, NOTCH, TGF- β , SHH and JNK (FALLAHI; O'DRISCOLL; MATAILLANAS, 2016; QIN et al., 2013; ZHOU; LI; WANG, 2017).

Nos pacientes com PV, aqui analisados, foram observadas correlações negativas entre a expressão do gene *MST1* com as citocinas/quimiocinas IL-1 β e RANTES e correlações negativas entre a expressão do gene *MST2* com as citocinas/quimiocinas IL1- β , IL-5, IL-6 e MIP-1 β . Na PV observamos ainda correlações negativas entre *SAVI* e IL1- β ; *LATS2* com IL1- β e RANTES, *MOB1B* e *TAZ* com IL-10, *AURKA* com IFN- α , IL1- β , IL-4, IL-6 e RANTES, enquanto que nos pacientes com MF observamos correlações negativas entre IL-12p70 com *MST2* e *AURKA*, além de correlações positivas entre a expressão de *LATS1* com TNF- α , *LATS2* com MIP-1 α , *MOB1B* com MIP1- α e *AURKA* com IL-5, evidenciando que o perfil inflamatório desses pacientes pode estar relacionado às alterações dos níveis de expressão dos genes da via Hippo nessas NMP. Estes dados corroboram com o resultado acima citado de Li e colaboradores que mostram que a depleção de *MST1* induz o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por TLR4/9 (LI et al., 2015b)

Apesar dos pacientes com TE apresentarem perfil inflamatório com a alta produção de citocinas/quimiocinas, não foi observada a correlação direta entre os níveis de expressão dos genes da via Hippo ou aurora quinases com a produção de citocinas/quimiocinas.

Foi observado em nosso estudo, a diminuição da expressão de *AURKA/AURKB* nos precursores CD34⁺ da medula óssea de pacientes com PV e TE, e a diminuição da expressão de *AURKB* em células CD34⁺ e leucócitos de pacientes com MF.

As auroras quinases, quando alteradas, podem desencadear o desenvolvimento tumoral, por induzirem defeitos na separação dos centrôssomos desencadeando a formação de um fuso monopolar e levando à mitose abortiva com formação de células tetraplóides (YE et al., 2009). Os resultados da expressão dos genes *AURKA/AURKB* verificado em pacientes com NMP Ph-negativos são contraditórios em relação aos descritos na literatura, que mostram o aumento da expressão dos genes *AURKA/AURKB* em tumores e relacionam esse achado ao desenvolvimento de osteosarcoma, glioblastoma e hepatocarcinoma. Esses resultados incentivaram os pesquisadores e as indústrias farmacêuticas a trabalharem no desenvolvimento e promoverem o uso dos inibidores de aurora quinases no tratamento de neoplasias hematológicas como na LMC e tumores sólidos (GAVRIILIDIS et al., 2018; LI et al., 2015a; TAVANTI et al., 2013).

Inibidores de aurora kinase tem sido ainda testados em associação ao inibidores de JAK2 para terapia de pacientes com mielofibrose, visto que a inibição de sinalização JAK/STAT é eficaz para suprimir as células hiperproliferativas, porém existem alguns desafios que incluem a toxicidade, resistência aos inibidores de JAK, bem como incapacidade de reduzir a carga de alelos mutantes, portanto, a concomitante inibição da *AURKA* quinase fornece uma nova estratégia para tratar MF, uma vez que seu inibidor, o MLN8237, induz a poliploidia e a maturação do megacariócitos (YANG; CRISPINO; WEN, 2017).

Outro dado interessante detectado nas desordens aqui estudadas é a relação entre o *status* mutacional e a desregulação da via Hippo, como observado pela maior expressão dos genes *SAVI* e *MOB1B* em pacientes com TE positivos para a mutação CALR. Além disso, os pacientes com TE com a mutação CALR expressam maiores níveis de *AURKB* em relação àqueles pacientes com a mutação JAK2V617F. Nos pacientes com MF observou-se maior expressão do gene *MST1* nos pacientes positivos para a mutação JAK2V617F e maior expressão do gene *AURKA* nos pacientes mutados para CALR. Observa-se ainda o aumento de IP-10 nos pacientes com MF com a mutação JAK2V617F em relação àqueles não mutados, indicando que os pacientes que carregam essa mutação apresentam um perfil mais pró-inflamatório, uma vez que tal citocina é induzida por estímulos pró-inflamatórios tais como IFN- γ e TNF- α (GOTSCH et

al., 2007). É possível notar também a maior expressão dos genes *MST1*, *MOB1B* e *AURKB* nos pacientes com MF com a mutação CALR em comparação aos pacientes com a mutação JAK2V617F.

Os pacientes com TE e MF com mutação CALR apresentam o curso mais indolente da doença e têm prognóstico mais favorável do que àqueles com a mutação JAK2V617F (KLAMPFL et al., 2013b; TEFFERI et al., 2014a), portanto o aumento da expressão de genes da via Hippo nos pacientes com a mutação CALR corroboram com nossa hipótese de que nas NMP a via Hippo desempenha papel anti-tumoral, regulando a proliferação celular exacerbada e resistência à apoptose.

Não houve expressão diferencial dos genes da via Hippo nas células CD34⁺ quando se compara as três NMP investigadas, porém há diferenças na expressão dos genes da via Hippo nos leucócitos desses pacientes. Na PV observa-se a menor expressão de *MST2* e maior expressão de *SAVI* em relação aos pacientes com TE e MF, além de maior expressão de *AURKA* em comparação com os pacientes com TE, enquanto que pacientes com MF apresentam menor expressão de *TAZ* e maior expressão de *AURKB* em relação aos pacientes com TE e PV, portanto, apesar da PV, TE e MF serem todas classificadas como parte do grupo de neoplasias mieloproliferativas cromossomo Filadélfia negativo, as mesmas apresentam características e fenótipos clínicos distintos, como os perfis de expressão dos genes da via Hippo e as aurora quinase, tal diferença pode ser devido a diferenças nos perfis de mutação presentes nestas doenças.

A figura 33 ilustra os principais achados relacionados à desregulação da via Hippo e associação com os genes da apoptose na PV, TE e MF.

Figura 33 - Representação esquemática das interações entre os genes da via Hippo, genes pró e anti-apoptóticos e citocinas. A via Hippo quando ativada por componentes regulatórios, sofre um processo de fosforilação em cascata que culmina na fosforilação dos componentes efetores YAP e TAZ com consequente retenção citosólica e degradação dos mesmos. Entretanto, quando não há ativação da via Hippo, os componentes não são fosforilados, permitindo que YAP e TAZ se transloquem para o núcleo da célula, onde se ligam ao complexo de fatores de transcrição TEAD1-4 e promovem a transcrição de genes envolvidos na morte e na proliferação celular. Os resultados aqui apresentados mostram que existe uma desregulação da expressão dos genes da via Hippo nas NMP que estão associados à desregulação da expressão de genes pró e anti-apoptóticos, desregulação da expressão dos genes AURKA e AURKB envolvidos no processo mitótico, além da associação com a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias.

9. Conclusão

Dentre os achados mais significativos observa-se nos pacientes com PV a diminuição da expressão dos genes supressores de tumor como *LATS2*, *MST1* e *MST2* que parece ter associação com o aumento de citocinas pró-inflamatórias e o perfil de resistência à apoptose evidenciado pela diminuição de genes pró-apoptóticos e aumento de genes anti-apoptóticos. Na TE também há a diminuição da expressão dos genes supressores de tumor *LATS1*, *LATS2*, *MST1* e *SAVI*, além da associação de maior expressão dos genes *SAVI* e *MOB1B* nos pacientes portadores da mutação *CALR*. Já os pacientes com MF possuem o perfil de expressão dos genes da via Hippo com redução da expressão de *SAVI* e *TAZ* e do gene *AURKB* do ciclo celular.

Nas três NMP observou-se o aumento da produção de citocinas que, como discutido anteriormente, parece estar associado à diminuição da expressão dos genes supressores de tumor da via Hippo. Além disso, a diminuição de expressão dos genes da via Hippo parece ainda ter relação direta à resistência à apoptose, evidenciada pela diminuição da expressão de genes pró-apoptóticos e aumento de genes anti-apoptóticos e as correlações diretas com os genes da via Hippo. Juntos, esses resultados indicam que a via Hippo parece contribuir para a fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas cromossomo Filadélfia negativas pela existência da associação entre a desregulação da expressão dos genes da via Hippo nas NMP com a desregulação da expressão de genes pró e anti-apoptóticos, desregulação da expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* envolvidos no processo mitóticos, além da associação com a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias.

10. Referências Bibliográficas

ABDOLLAHPOUR, H. et al. The phenotype of human STK4 deficiency. **Blood**, v. 119, n. 15, p. 3450–3457, 12 abr. 2012.

ALISON, M. R.; SARRAF, C. E. Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. **Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 26, n. 1, p. 25–35, jan. 1992.

ALVAREZ-LARRÁN, A. et al. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. **British Journal of Haematology**, v. 146, n. 5, p. 504–509, set. 2009.

ANDREWS, P. D. et al. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. **Developmental Cell**, v. 6, n. 2, p. 253–268, fev. 2004.

ARAKI, M.; KOMATSU, N. Novel molecular mechanism of cellular transformation by a mutant molecular chaperone in myeloproliferative neoplasms. **Cancer Science**, v. 108, n. 10, p. 1907–1912, out. 2017.

ARANA-YI, C. et al. Advances in the therapy of chronic idiopathic myelofibrosis. **The Oncologist**, v. 11, n. 8, p. 929–943, set. 2006.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5381, p. 1305–1308, 28 ago. 1998.

BADOUEL, C.; GARG, A.; MCNEILL, H. Herding Hippos: regulating growth in flies and man. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 6, p. 837–843, dez. 2009.

BAROSI, G. An immune dysregulation in MPN. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 9, n. 4, p. 331–339, dez. 2014.

BASU, D.; REYES-MÚGICA, M.; REBBAA, A. Histone acetylation-mediated regulation of the Hippo pathway. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e62478, 2013.

BASU, S. et al. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. **Molecular Cell**, v. 11, n. 1, p. 11–23, jan. 2003.

BEER, P. A. et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. **Blood**, v. 112, n. 1, p. 141–149, 1 jul. 2008.

BISCHOFF, J. R. et al. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. **The EMBO journal**, v. 17, n. 11, p. 3052–3065, 1 jun. 1998.

BLUM, S.; MARTINS, F.; ALBERIO, L. Ruxolitinib in the treatment of polycythemia vera: patient selection and special considerations. **Journal of Blood Medicine**, v. 7, p. 205–215, 2016.

BORO, M.; SINGH, V.; BALAJI, K. N. Mycobacterium tuberculosis-triggered Hippo pathway orchestrates CXCL1/2 expression to modulate host immune responses. **Scientific Reports**, v. 6, p. 37695, 24 2016.

CACEMIRO, M. DA C. et al. Hippo pathway deregulation: implications in the pathogenesis of haematological malignancies. **Journal of Clinical Pathology**, v. 70, n. 1, p. 9–14, 2017.

CACEMIRO, M. DA C. et al. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms as disorders marked by cytokine modulation. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, mar. 2018.

CAMPO, E. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5019–5032, 12 maio 2011.

CAROBIO, A. et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. **Blood**, v. 117, n. 22, p. 5857–5859, 2 jun. 2011.

CAZZOLA, M.; KRALOVICS, R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3714–3719, 12 jun. 2014.

CHACHOUA, I. et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. **Blood**, v. 127, n. 10, p. 1325–1335, 10 mar. 2016.

CHEN, M. et al. Effect of YAP Inhibition on Human Leukemia HL-60 Cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 9, p. 902–910, 2017.

CHESON, B. D.; RUMMEL, M. J. Bendamustine: rebirth of an old drug. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 9, p. 1492–1501, 20 mar. 2009.

CHI, J. et al. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1152–1154, maio 2014.

COELHO-DOS-REIS, J. G. A. et al. Immunological Profile of HTLV-1-Infected Patients Associated with Infectious or Autoimmune Dermatological Disorders. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. e2328, 25 jul. 2013.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647–656, set. 2002.

COTTINI, F. et al. Rescue of Hippo coactivator YAP1 triggers DNA damage-induced apoptosis in hematological cancers. **Nature Medicine**, v. 20, n. 6, p. 599–606, jun. 2014.

COUZENS, A. L. et al. Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. **Science Signaling**, v. 6, n. 302, p. rs15, 19 nov. 2013.

CREQUER, A. et al. Inherited MST1 deficiency underlies susceptibility to EV-HPV infections. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e44010, 2012.

DAI, C. H. et al. Polycythaemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression. **British Journal of Haematology**, v. 86, n. 1, p. 12–21, jan. 1994.

DAMESHEK, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. **Blood**, v. 6, n. 4, p. 372–375, abr. 1951.

DE CRISTOFARO, T. et al. TAZ/WWTR1 is overexpressed in papillary thyroid carcinoma. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 47, n. 6, p. 926–933, abr. 2011a.

DE CRISTOFARO, T. et al. TAZ/WWTR1 is overexpressed in papillary thyroid carcinoma. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 47, n. 6, p. 926–933, abr. 2011b.

DENYS, B. et al. A real-time polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive, and specific quantification of the JAK2V617F mutation using a locked nucleic acid-modified oligonucleotide. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 12, n. 4, p. 512–519, jul. 2010.

DHYANI, A. et al. ANKHD1 regulates cell cycle progression and proliferation in multiple myeloma cells. **FEBS letters**, v. 586, n. 24, p. 4311–4318, 14 dez. 2012.

DONATO, E. et al. YAP and TAZ are dispensable for physiological and malignant haematopoiesis. **Leukemia**, 26 mar. 2018.

DONG, J. et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1120–1133, 21 set. 2007.

EHSANIAN, R. et al. YAP dysregulation by phosphorylation or Δ Np63-mediated gene repression promotes proliferation, survival and migration in head and neck cancer subsets. **Oncogene**, v. 29, n. 46, p. 6160–6171, 18 nov. 2010.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

FALLAHI, E.; O'DRISCOLL, N. A.; MATAILLANAS, D. The MST/Hippo Pathway and Cell Death: A Non-Canonical Affair. **Genes**, v. 7, n. 6, 17 jun. 2016.

FENG, X. et al. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. **Cancer Cell**, v. 25, n. 6, p. 831–845, 16 jun. 2014.

FINAZZI, G.; BARBUI, T. Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Leukemia**, v. 22, n. 8, p. 1494–1502, ago. 2008.

GATEFF, E. Cancer, genes, and development: the Drosophila case. **Advances in Cancer Research**, v. 37, p. 33–74, 1982.

GAVRIILIDIS, P. et al. Targeting hepatocarcinogenesis model in C56BL6 mice with pan-aurora kinase inhibitor Danusertib. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 5, p. 914–922, 2018.

GHOLAMI, M. et al. The expression analysis of LATS2 gene in de novo AML patients. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 31, n. 5, p. 961, maio 2014.

GOLDENSON, B.; CRISPINO, J. D. The aurora kinases in cell cycle and leukemia. **Oncogene**, v. 34, n. 5, p. 537–545, 29 jan. 2015.

GOTSCH, F. et al. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 20, n. 11, p. 777–792, nov. 2007.

GUGLIELMELLI, P. et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. **British Journal of Haematology**, v. 137, n. 3, p. 244–247, maio 2007.

GUIMARÃES, A. G. D. P. et al. CD11c+CD123Low dendritic cell subset and the triad TNF- α /IL-17A/IFN- γ integrate mucosal and peripheral cellular responses in HIV patients with high-grade anal intraepithelial neoplasia: a systems biology approach. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 68, n. 2, p. 112–122, 1 fev. 2015.

HALDER, G.; JOHNSON, R. L. Hippo signaling: growth control and beyond. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, n. 1, p. 9–22, jan. 2011.

HALL, C. A. et al. Hippo pathway effector Yap is an ovarian cancer oncogene. **Cancer Research**, v. 70, n. 21, p. 8517–8525, 1 nov. 2010.

HARRISON, C. Rethinking disease definitions and therapeutic strategies in essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2010, p. 129–134, 2010.

HARTMANN, E. M. et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 953–961, 12 ago. 2010.

HARVEY, K. F.; ZHANG, X.; THOMAS, D. M. The Hippo pathway and human cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 13, n. 4, p. 246–257, abr. 2013.

HARVEY, K.; TAPON, N. The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, n. 3, p. 182–191, mar. 2007.

HERMOUET, S.; BIGOT-CORBEL, E.; GARDIE, B. Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 145293, 2015.

HONG, W.; GUAN, K.-L. The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, n. 7, p. 785–793, set. 2012.

HUIJSMANS, C. J. J. et al. Sensitive detection and quantification of the JAK2V617F allele by real-time PCR blocking wild-type amplification by using a peptide nucleic acid oligonucleotide. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 13, n. 5, p. 558–564, set. 2011.

JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1144–1148, 28 abr. 2005.

JI, T. et al. Decreased expression of LATS1 is correlated with the progression and prognosis of glioma. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 31, p. 67, 21 ago. 2012.

JIANG, J. et al. SAV1 represses the development of human colorectal cancer by regulating the Akt-mTOR pathway in a YAP-dependent manner. **Cell Proliferation**, v. 50, n. 4, ago. 2017.

JIMÉNEZ-VELASCO, A. et al. Downregulation of the large tumor suppressor 2 (LATS2/KPM) gene is associated with poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 19, n. 12, p. 2347–2350, dez. 2005.

KAESTNER, P.; STOLZ, A.; BASTIANS, H. Determinants for the efficiency of anticancer drugs targeting either Aurora-A or Aurora-B kinases in human colon carcinoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 7, p. 2046–2056, jul. 2009.

KAWAHARA, M. et al. Kpm/Lats2 is linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3856–3866, 1 nov. 2008.

KE, H. et al. Putative tumor suppressor Lats2 induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and Bcl-x(L). **Experimental Cell Research**, v. 298, n. 2, p. 329–338, 15 ago. 2004.

KE, Y. W. et al. Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. **Cell Research**, v. 13, n. 2, p. 69–81, abr. 2003.

KILADJIAN, J.-J. et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4922–4929, 15 maio 2008.

KILPIVAARA, O.; LEVINE, R. L. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. **Leukemia**, v. 22, n. 10, p. 1813–1817, out. 2008.

KIM, M. et al. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. **Cell Reports**, v. 11, n. 2, p. 270–282, 14 abr. 2015.

KIM, T.-S. et al. Mammalian sterile 20-like kinase 1 suppresses lymphoma development by promoting faithful chromosome segregation. **Cancer Research**, v. 72, n. 20, p. 5386–5395, 15 out. 2012.

KISCHKEL, F. C. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO journal**, v. 14, n. 22, p. 5579–5588, 15 nov. 1995.

KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2379–2390, 19 dez. 2013a.

KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2379–2390, 19 dez. 2013b.

KOSAKA, Y. et al. Clinical significance of the loss of MATS1 mRNA expression in colorectal cancer. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 2, p. 333–338, ago. 2007.

LAN, W. et al. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. **Current biology: CB**, v. 14, n. 4, p. 273–286, 17 fev. 2004.

LEE, M. et al. Hippo-Yap signaling in ocular development and disease. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, 13 mar. 2018.

LEVINE, R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 387–397, abr. 2005.

LEVINE, R. L. et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4139–4141, 15 maio 2006.

LI, H. et al. Inhibition of YAP suppresses CML cell proliferation and enhances efficacy of imatinib in vitro and in vivo. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 35, n. 1, p. 134, 06 2016a.

LI, L. et al. Deacetylation of tumor-suppressor MST1 in Hippo pathway induces its degradation through HBXIP-elevated HDAC6 in promotion of breast cancer growth. **Oncogene**, v. 35, n. 31, p. 4048–4057, 4 ago. 2016b.

LI, N. et al. Radiotherapy Followed by Aurora Kinase Inhibition Targets Tumor-Propagating Cells in Human Glioblastoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 419–428, 1 fev. 2015a.

LI, W. et al. STK4 regulates TLR pathways and protects against chronic inflammation-related hepatocellular carcinoma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 11, p. 4239–4254, 2 nov. 2015b.

LI, Y. et al. Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition. **Oncogene**, v. 22, n. 28, p. 4398–4405, 10 jul. 2003.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 23 fev. 2001.

LORTHONGPANICH, C. et al. The Hippo pathway regulates human megakaryocytic differentiation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, n. 1, p. 116–126, 05 2017.

- LUIZA-SILVA, M. et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 873–883, 15 set. 2011.
- MACHADO-NETO, J. A. et al. YAP1 expression in myelodysplastic syndromes and acute leukemias. **Leukemia & Lymphoma**, v. 55, n. 10, p. 2413–2415, out. 2014.
- MARSOLA, A. P. Z. C. et al. Expression of Hippo signaling pathway and Aurora kinase genes in chronic myeloid leukemia. **Medical Oncology**, v. 35, n. 3, mar. 2018.
- MASSARO, P. et al. Polycythemia vera treated with recombinant interferon-alpha 2a: evidence of a selective effect on the malignant clone. **American Journal of Hematology**, v. 56, n. 2, p. 126–128, out. 1997.
- MCPHERSON, J. P. et al. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. **The EMBO journal**, v. 23, n. 18, p. 3677–3688, 15 set. 2004.
- MESA, R. A. et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). **Leukemia Research**, v. 31, n. 6, p. 737–740, jun. 2007.
- MIRZA, A. M.; EZZAT, S.; AXELRAD, A. A. Insulin-like growth factor binding protein-1 is elevated in patients with polycythemia vera and stimulates erythroid burst formation in vitro. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1862–1869, 15 mar. 1997.
- MITRA, D. et al. Symptom burden and splenomegaly in patients with myelofibrosis in the United States: a retrospective medical record review. **Cancer Medicine**, v. 2, n. 6, p. 889–898, dez. 2013.
- MOROISHI, T. et al. A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. **Genes & Development**, v. 29, n. 12, p. 1271–1284, 15 jun. 2015.
- MOULARD, O. et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. **European Journal of Haematology**, v. 92, n. 4, p. 289–297, abr. 2014.

MURAMATSU, T. et al. YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 3, p. 389–398, mar. 2011.

NANGALIA, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2391–2405, 19 dez. 2013.

NAZHA, A.; GERDS, A. T. Where to Turn for Second-Line Cytoreduction After Hydroxyurea in Polycythemia Vera? **The Oncologist**, v. 21, n. 4, p. 475–480, abr. 2016.

NEHME, N. T. et al. MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. **Blood**, v. 119, n. 15, p. 3458–3468, 12 abr. 2012.

NGUYEN, H. G. et al. Deregulated Aurora-B induced tetraploidy promotes tumorigenesis. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 8, p. 2741–2748, ago. 2009.

OGAWA, S. et al. Identification of a fusion gene composed of a Hippo pathway gene MST2 and a common translocation partner ETV6 in a recurrent translocation t(8;12)(q22;p13) in acute myeloid leukemia. **Annals of Hematology**, v. 94, n. 8, p. 1431–1433, ago. 2015.

PARDANANI, A. D. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3472–3476, 15 nov. 2006.

PIETRA, D. et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1686–1689, 1 fev. 2008.

PIKMAN, Y. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLoS medicine**, v. 3, n. 7, p. e270, jul. 2006a.

PIKMAN, Y. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLoS medicine**, v. 3, n. 7, p. e270, jul. 2006b.

PLO, I. et al. Genetic Alterations of the Thrombopoietin/MPL/JAK2 Axis Impacting Megakaryopoiesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 12 set. 2017.

PLOUFFE, S. W.; HONG, A. W.; GUAN, K.-L. Disease implications of the Hippo/YAP pathway. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 212–222, abr. 2015.

QIN, F. et al. Mst1 and Mst2 kinases: regulations and diseases. **Cell & Bioscience**, v. 3, n. 1, p. 31, 28 ago. 2013.

RUMI, E. et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. **Blood**, v. 123, n. 10, p. 1544–1551, 6 mar. 2014.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861–2874, 12 abr. 2004.

SANSORES-GARCIA, L. et al. Mask is required for the activity of the Hippo pathway effector Yki/YAP. **Current biology: CB**, v. 23, n. 3, p. 229–235, 4 fev. 2013.

SASAKI, H. et al. Human MOB1 expression in non-small-cell lung cancer. **Clinical Lung Cancer**, v. 8, n. 4, p. 273–276, jan. 2007.

SCOTT, L. M. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 5, p. 459–468, 1 fev. 2007.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003.

SHVIDEL, L. et al. Busulphan is safe and efficient treatment in elderly patients with essential thrombocythemia. **Leukemia**, v. 21, n. 9, p. 2071–2072, set. 2007.

SPIVAK, J. L. et al. Chronic myeloproliferative disorders. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 200–224, 2003.

SPIVAK, J. L. et al. Two Clinical Phenotypes in Polycythemia Vera. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 9, p. 808–817, 28 ago. 2014.

SPIVAK, J. L. Myeloproliferative Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 22, p. 2168–2181, jun. 2017.

STEENSMA, D. P. et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1207–1209, 15 ago. 2005.

STEENSMA, D. P. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 8, n. 4, p. 397–411; quiz 526, set. 2006.

STEIN, B. L.; MOLITERNO, A. R.; TIU, R. V. Polycythemia vera disease burden: contributing factors, impact on quality of life, and emerging treatment options. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 12, p. 1965–1976, dez. 2014.

SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2375–2390, 19 maio 2016.

TAKAHASHI, Y. et al. Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1380–1385, 15 fev. 2005.

TANG, F. et al. hMOB3 modulates MST1 apoptotic signaling and supports tumor growth in glioblastoma multiforme. **Cancer Research**, v. 74, n. 14, p. 3779–3789, 15 jul. 2014.

TAVANTI, E. et al. Preclinical validation of Aurora kinases-targeting drugs in osteosarcoma. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 10, p. 2607–2618, nov. 2013.

TAYLOR, R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography**, v. 6, n. 1, p. 35–39, jan. 1990.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231–241, mar. 2008.

TEFFERI, A. et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. **Leukemia**, v. 28, n. 7, p. 1472–1477, jul. 2014a.

TEFFERI, A. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 16, p. 2507–2513; quiz 2615, 16 out. 2014b.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 12, p. 1262–1271, dez. 2016.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management: TEFFERI and BARBUI. **American Journal of Hematology**, v. 92, n. 1, p. 94–108, jan. 2017.

TERADA, Y. Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 6, p. 653–657, dez. 2001.

THEM, N. C. C.; KRALOVICS, R. Genetic basis of MPN: Beyond JAK2-V617F. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 8, n. 4, p. 299–306, dez. 2013.

TOJI, S. et al. The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. **Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms**, v. 9, n. 5, p. 383–397, maio 2004.

VANNUCCHI, A. M. et al. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. **Leukemia**, v. 22, n. 7, p. 1299–1307, jul. 2008a.

VANNUCCHI, A. M. et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 844–847, 1 ago. 2008b.

VERNOS, I.; KARSENTI, E. Chromosomes take the lead in spindle assembly. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 8, p. 297–301, ago. 1995.

VERSTOVSEK, S. et al. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 Inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. **Cancer**, v. 120, n. 4, p. 513–520, 15 fev. 2014.

VIGNERON, A. M.; LUDWIG, R. L.; VOUSDEN, K. H. Cytoplasmic ASPP1 inhibits apoptosis through the control of YAP. **Genes & Development**, v. 24, n. 21, p. 2430–2439, 1 nov. 2010.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, n. 5, p. 516–525, nov. 2008.

VOUSDEN, K. H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 8, p. 594–604, ago. 2002.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5573, p. 1635–1636, 31 maio 2002.

WEI, Z. et al. Overexpression of Hippo pathway effector TAZ in tongue squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological features and patients' prognosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 42, n. 10, p. 747–754, nov. 2013.

WILLIAMS, D. M. et al. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. **Experimental Hematology**, v. 35, n. 11, p. 1641–1646, nov. 2007.

WU, S. et al. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. **Cell**, v. 114, n. 4, p. 445–456, 22 ago. 2003.

XIE, S.-L. et al. [Expression of Hippo signaling pathway core element MST1 in acute leukemia patients and its significance]. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 20, n. 3, p. 527–530, jun. 2012.

YABUTA, N. et al. The tumor suppressor Lats2 is pivotal in Aurora A and Aurora B signaling during mitosis. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 10, n. 16, p. 2724–2736, 15 ago. 2011.

YABUTA, N. et al. Large tumor suppressors 1 and 2 regulate Aurora-B through phosphorylation of INCENP to ensure completion of cytokinesis. **Heliyon**, v. 2, n. 7, p. e00131, jul. 2016.

YANG, J. et al. CD34⁺/CD38⁻ acute myelogenous leukemia cells aberrantly express Aurora kinase A. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 11, p. 2706–2719, 1 dez. 2013.

YANG, Q.; CRISPINO, J. D.; WEN, Q. J. Kinase signaling and targeted therapy for primary myelofibrosis. **Experimental Hematology**, v. 48, p. 32–38, 2017.

YARBRO, J. W. Mechanism of action of hydroxyurea. **Seminars in Oncology**, v. 19, n. 3 Suppl 9, p. 1–10, jun. 1992.

YE, D. et al. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Journal of Hematopathology**, v. 2, n. 1, p. 2–8, mar. 2009.

YUAN, M. et al. Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 11, p. 1752–1759, nov. 2008.

ZHAO, B. et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. **Genes & Development**, v. 22, n. 14, p. 1962–1971, 15 jul. 2008.

ZHAO, D. et al. TAZ antagonizes the WWP1-mediated KLF5 degradation and promotes breast cell proliferation and tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 1, p. 59–67, jan. 2012.

ZHOU, D. et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. **Cancer Cell**, v. 16, n. 5, p. 425–438, 6 nov. 2009.

ZHOU, H. et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 189–193, out. 1998.

ZHOU, X.; LI, W.; WANG, H. The roles and mechanisms of MST1/2 in the innate immune response. **Yi Chuan = Hereditas**, v. 39, n. 7, p. 642–649, 20 2017.

11. Apêndices

APÊNDICE A - Dados demográficos e resultados da mutação JAK2V617F dos pacientes doadores de sangue periférico

MIELOFIBROSE PRIMÁRIA	IDADE	GÊNERO	COR DA PELE	JAK2V617F
SPP11	71	FEMININO	BRANCA	+
SPP22	41	MASCULINO	BRANCA	-
SPP24	64	MASCULINO	BRANCA	-
SPP27	52	MASCULINO	BRANCA	-
SPP34	68	MASCULINO	BRANCA	-
SPP41	50	FEMININO	BRANCA	-
SPP44	50	FEMININO	BRANCA	-
SPP50	59	FEMININO	BRANCA	+
SPP51	58	MASCULINO	BRANCA	+
SPP52	62	MASCULINO	BRANCA	+
SPP58	69	MASCULINO	BRANCA	-
SPP69	73	MASCULINO	NEGRA	-
SPP72	80	MASCULINO	BRANCA	+
SPP97	73	MASCULINO	BRANCA	+
SPP103	79	MASCULINO	BRANCA	+
SPP113	65	FEMININO	BRANCA	-
SPP115	58	MASCULINO	BRANCA	+
SPP116	65	MASCULINO	BRANCA	-
SPP130	76	FEMININO	BRANCA	+
SPP141	63	MASCULINO	BRANCA	+
SPP147	44	FEMININO	BRANCA	+
SPP152	51	MASCULINO	BRANCA	+
POLICITEMIA VERA	IDADE	GÊNERO	COR DA PELE	JAK2V617F
SPP3	66	FEMININO	BRANCA	+
SPP8	80	FEMININO	BRANCA	+
SPP13	54	FEMININO	NEGRA	+
SPP17	58	MASCULINO	BRANCA	+
SPP25	59	MASCULINO	BRANCA	+
SPP30	54	FEMININO	BRANCA	+
SPP31	60	FEMININO	NEGRA	+
SPP32	68	FEMININO	BRANCA	+
SPP33	83	FEMININO	BRANCA	+
SPP46	45	MASCULINO	NEGRA	+
SPP47	73	FEMININO	BRANCA	+
SPP59	65	MASCULINO	BRANCA	+
SPP77	76	MASCULINO	AMARELA	+
SPP80	46	MASCULINO	BRANCA	+
SPP83	75	MASCULINO	BRANCA	+
SPP85	60	MASCULINO	BRANCA	+
SPP86	57	MASCULINO	BRANCA	+
SPP87	51	FEMININO	BRANCA	+
SPP89	79	MASCULINO	BRANCA	+
SPP90	61	MASCULINO	AMARELA	+
SPP96	78	MASCULINO	BRANCA	+
SPP99	65	FEMININO	BRANCA	+
SPP100	69	FEMININO	BRANCA	-
SPP101	69	FEMININO	AMARELA	+
SPP102	61	FEMININO	BRANCA	+
SPP105	78	FEMININO	BRANCA	+
SPP106	67	MASCULINO	BRANCA	+
SPP108	65	MASCULINO	BRANCA	+
SPP132	72	FEMININO	NEGRA	+

SPP134	57	FEMININO	BRANCA	+
SPP137	68	FEMININO	NEGRA	+
TROMBOCITEMIA ESSENCIAL	IDADE	GÊNERO	COR DA PELE	JAK2V617F
SPP2	41	FEMININO	BRANCA	+
SPP4	66	MASCULINO	BRANCA	+
SPP5	40	FEMININO	BRANCA	-
SPP6	58	FEMININO	BRANCA	+
SPP7	60	MASCULINO	BRANCA	-
SPP9	68	FEMININO	BRANCA	-
SPP10	54	MASCULINO	BRANCA	-
SPP12	66	FEMININO	BRANCA	-
SPP15	62	FEMININO	NEGRA	-
SPP19	50	FEMININO	BRANCA	-
SPP21	51	FEMININO	BRANCA	-
SPP26	75	FEMININO	BRANCA	-
SPP28	74	FEMININO	BRANCA	-
SPP29	32	FEMININO	BRANCA	-
SPP35	79	FEMININO	NEGRA	+
SPP37	59	MASCULINO	BRANCA	+
SPP43	70	FEMININO	BRANCA	+
SPP49	75	FEMININO	NEGRA	+
SPP53	62	MASCULINO	BRANCA	-
SPP54	59	FEMININO	BRANCA	-
SPP55	35	FEMININO	BRANCA	+
SPP56	85	FEMININO	BRANCA	-
SPP66	77	FEMININO	BRANCA	-
SPP67	74	MASCULINO	BRANCA	+
SPP78	20	FEMININO	BRANCA	-
SPP79	54	MASCULINO	BRANCA	-
SPP81	36	FEMININO	BRANCA	+
SPP88	44	MASCULINO	BRANCA	-
SPP94	65	FEMININO	BRANCA	-
SPP111	57	FEMININO	NEGRA	-
SPP123	62	MASCULINO	BRANCA	+
SPP127	53	FEMININO	BRANCA	-
SPP129	77	FEMININO	BRANCA	-
SPP133	41	FEMININO	BRANCA	+
SPP140	54	FEMININO	NEGRA	+

SPP: Sangue periférico de pacientes.

APÊNDICE B - Dados demográficos dos controles doadores de sangue periférico.

CONTROLES	IDADE	GÊNERO	COR DA PELE	JAK2V617F
SPC2	53	FEMININO	BRANCA	-
SPC3	41	FEMININO	BRANCA	-
SPC6	59	MASCULINO	NEGRA	-
SPC8	50	FEMININO	BRANCA	-
SPC10	50	MASCULINO	BRANCA	-
SPC11	68	FEMININO	BRANCA	-
SPC13	49	FEMININO	BRANCA	-
SPC15	50	MASCULINO	BRANCA	-
SPC16	46	FEMININO	BRANCA	-
SPC17	83	FEMININO	BRANCA	-
SPC18	31	FEMININO	BRANCA	-
SPC19	66	FEMININO	NEGRA	-
SPC20	58	MASCULINO	BRANCA	-
SPC22	54	FEMININO	NEGRA	-
SPC23	72	MASCULINO	BRANCA	-
SPC24	38	FEMININO	BRANCA	-
SPC25	60	FEMININO	BRANCA	-
SCP26	56	FEMININO	BRANCA	-
SPC27	61	FEMININO	BRANCA	-
SPC28	65	MASCULINO	BRANCA	-
SPC28	60	FEMININO	BRANCA	-
SPC30	52	MASCULINO	BRANCA	-
SPC31	51	MASCULINO	BRANCA	-
SPC32	61	FEMININO	BRANCA	-
SPC33	61	FEMININO	BRANCA	-
SPC34	76	FEMININO	BRANCA	-
SPC35	69	FEMININO	BRANCA	-
SPC36	77	FEMININO	BRANCA	-
SPC37	54	FEMININO	BRANCA	-
SPC38	76	FEMININO	BRANCA	-
SPC39	78	FEMININO	BRANCA	-
SPC40	71	MASCULINO	BRANCA	-
SPC41	71	FEMININO	BRANCA	-
SPC42	58	MASCULINO	BRANCA	-
SPC43	70	MASCULINO	BRANCA	-
SPC44	48	FEMININO	BRANCA	-
SPC45	54	FEMININO	BRANCA	-
SPC46	48	FEMININO	BRANCA	-
SPC48	47	FEMININO	BRANCA	-
SPC49	57	MASCULINO	BRANCA	-
SPC50	54	FEMININO	BRANCA	-
SPC51	33	FEMININO	BRANCA	-
SPC52	80	MASCULINO	BRANCA	-
SPC53	20	FEMININO	BRANCA	-
SPC55	56	MASCULINO	BRANCA	-
SPC56	51	MASCULINO	BRANCA	-
SPC57	56	FEMININO	BRANCA	-
SPC58	76	FEMININO	BRANCA	-
SPC59	68	FEMININO	BRANCA	-
SPC60	34	FEMININO	BRANCA	-
SPC62	47	FEMININO	BRANCA	-
SPC63	52	MASCULINO	BRANCA	-
SPC64	57	MASCULINO	BRANCA	-
SPC66	54	FEMININO	BRANCA	-
SPC67	50	MASCULINO	NEGRA	-

SPC68	68	MASCULINO	BRANCA	-
SPC70	51	MASCULINO	BRANCA	-
SPC71	49	FEMININO	BRANCA	-
SPC73	47	FEMININO	BRANCA	-
SPC75	23	MASCULINO	BRANCA	-

SPC: Sangue periférico de controle

APÊNDICE C - Dados demográficos e resultados da mutação JAK2V617F dos pacientes doadores de medula óssea.

POLICITEMIA VERA	IDADE	GÊNERO	COR DA PELE	JAK2V617F
MOP 8	80	FEMININO	BRANCA	+
MOP 13	54	FEMININO	NEGRA	+
MOP 17	58	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 30	54	FEMININO	BRANCA	+
MOP 77	76	MASCULINO	AMARELA	+
MOP 80	46	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 83	75	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 85	60	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 87	51	FEMININO	BRANCA	+
MOP 89	79	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 90	61	MASCULINO	AMARELA	+
MOP 96	78	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 99	65	FEMININO	BRANCA	+
MOP 100	69	FEMININO	BRANCA	-
MOP 102	61	FEMININO	BRANCA	+
MIELOFIBROSE PRIMÁRIA	IDADE	GÊNERO	COR DA PELE	JAK2V617F
MOP 22	41	MASCULINO	BRANCA	-
MOP 24	64	MASCULINO	BRANCA	-
MOP 34	68	MASCULINO	BRANCA	-
MOP 44	61	FEMININO	BRANCA	-
MOP 58	69	MASCULINO	BRANCA	-
MOP 72	80	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 97	73	MASCULINO	BRANCA	+
TROMBOCITEMIA ESSENCIAL	IDADE	GÊNERO	COR DA PELE	JAK2V617F
MOP 4	66	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 6	58	FEMININO	BRANCA	+
MOP 7	60	MASCULINO	BRANCA	-
MOP 12	66	FEMININO	BRANCA	-
MOP 15	62	FEMININO	NEGRA	-
MOP 20	67	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 54	59	FEMININO	BRANCA	-
MOP 55	35	FEMININO	BRANCA	+
MOP 61	71	FEMININO	BRANCA	-
MOP 62	68	FEMININO	BRANCA	-
MOP 63	53	FEMININO	BRANCA	+
MOP 67	74	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 79	54	MASCULINO	BRANCA	-
MOP 81	36	FEMININO	BRANCA	+
MOP 88	44	MASCULINO	BRANCA	-
MOP 91	81	MASCULINO	BRANCA	+
MOP 93	59	FEMININO	NEGRA	+
MOP 94	65	FEMININO	BRANCA	-
MOP 95	56	FEMININO	BRANCA	-
MOP 104	43	FEMININO	BRANCA	+

MOP = Medula óssea de paciente.

APÊNDICE D - Dados demográficos dos controles. Amostras de medula óssea

CONTROLES	IDADE	GÊNERO	COR DA PELE	JAK2V617F
MOC 3	30	MASCULINO	BRANCA	-
MOC 4	36	MASCULINO	BRANCA	-
MOC 5	54	MASCULINO	BRANCA	-
MOC 11	21	FEMININO	BRANCA	-
MOC 13	30	MASCULINO	BRANCA	-
MOC14	32	FEMININO	BRANCA	-
MOC 15	20	FEMININO	BRANCA	-
MOC 17	30	MASCULINO	BRANCA	-
MOC 19	28	MASCULINO	BRANCA	-
MOC 20	48	MASCULINO	BRANCA	-
MOC 21	21	FEMININO	BRANCA	-
MOC 22	16	MASCULINO	BRANCA	-
MOC 23	25	FEMININO	BRANCA	-
MOC 24	19	FEMININO	BRANCA	-
MOC25	46	FEMININO	BRANCA	-

MOC = Medula óssea de controles.

APÊNDICE E - Resumo dos principais achados na policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária.

Policitemia Vera

- diminuição de *MOB1A*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* na medula óssea e diminuição de *MST1*, *MST2* e *LATS2* no sangue periférico;
- correlação negativa entre a expressão de *LATS2* e o número de plaquetas;
- diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* e aumento da expressão dos genes *BCL-2* e *BCL-X_L*;
- Correlação negativa entre a expressão do gene pró-apoptótico *BAD* e a expressão dos genes da via Hippo *MST1*, *MST2*, *LATS1*, *LATS2*, *MOB1A*, *MOB1B* e *TAZ* e a expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* envolvidos no ciclo celular;
- Correlações negativas entre os genes da via Hippo e os níveis de citocinas: *MST1*, *MST2*, *SAV1*, *LATS2* e *AURKA* com IL-1 β ; *MST2*, *LATS2* e *AURKB* com RANTES; *MOB1B* e *TAZ* com IL-10; *MST2* e *AURKA* com IL-6; *MST2* com IL-5; *AURKA* com IFN- α e IL-4.

Trombocitemia Essencial

- diminuição de *MOB1A*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* na medula óssea e diminuição de *MST1*, *MST2* e *LATS2* no sangue periférico;
- Associação com o *status* mutacional, observado pela maior expressão de *SAV1* e *MOB1B* nos pacientes portadores da mutação *CALR* e maior expressão de *AURKB* nos pacientes mutados para *CALR* em relação aos pacientes mutados para *JAK2V617F*;
- diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK* e aumento da expressão dos genes *BCL-2* e *BCL-X_L*;
- Correlações negativas entre a expressão do gene pró-apoptótico *BAD* e os genes da via Hippo *MST2*, *MOB1A* e *MOB1B* e a expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* envolvidos no ciclo celular.

Mielofibrose Primária

- diminuição de *AURKB* na medula óssea e diminuição de *SAV1*, *TAZ* e *AURKB* no sangue periférico;
- Associação com o *status* mutacional, observado pela maior expressão de *MST1* nos pacientes sem a mutação *JAK2V617F*, maior expressão de *AURKA* nos pacientes portadores da mutação *CALR* em comparação aos não mutados e maior expressão de *MST1*, *MOB1B* e

AURKB nos pacientes mutados para CALR em relação aos pacientes mutados para JAK2V617F; aumento do nível de IP-10 nos pacientes portadores da mutação JAK2V617F;

- Correlações negativas entre a expressão de genes da via Hippo e os parâmetros hematológicos analisados: *MST1*, *MOB1A* e *MOB1B* com o número de glóbulos brancos; *MST1* e *AURKB* com a contagem de plaquetas; *LATS1* com VCM e HCM e *LATS2* com CHCM;

- diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos *BAD* e *BAK*;

- Correlações positivas entre o gene pró-apoptótico *BAK* e *SAV1*; *BCL-2* com *MST1*, *MST2* e *MOB1A* e entre *BCL-X_L* com *MST1*, *SAV1*, *MOB1A* e *MOB1B*;

- Correlações negativas entre a expressão de *MST-2* e *AURKB* e o nível de IL-12p70 e correlações positivas entre: *LATS1* com TNF- α , *LATS2* e *MOB1B* com MIP-1 α e *AURKB* com IL-5.

12. Anexos

ANEXO A - Aprovação do Biorrepositório do laboratório de Hematologia da Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 033/2013
dfav

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2013.

A

Prof.ª Dr.ª Fabiola Attié de Castro
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou em sua 118ª Sessão Extraordinária realizada em 24 de junho de 2013, o reconhecimento do Biorrepositório FCFRP nº 003, intitulado **"BIORREPOSITÓRIO DO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DA FCFRP"**, sob sua responsabilidade.

De acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos. Lembramos que ainda, que, de acordo com a Resolução 441, toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado deverá ser submetida para aprovação deste CEP e que a legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biorrepositórios.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Maria Regina Torqueti
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCFRP/USP

ANEXO B - Aprovação do Comitê de ética em pesquisa com humanos na Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 012/2015
kms

Ribeirão Preto, 7 de abril de 2015.

À pós-graduanda
Maíra da Costa Cacemiro
Orientadora: Profª. Drª. Fabíola Attié de Castro
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP aprovou, em sua 135ª reunião ordinária realizada em 03/10/2014, o projeto de pesquisa intitulado **"EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA VIA HIPPO/LATS EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS"**, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 348**.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de **emenda** na Plataforma Brasil.

Segue anexa a declaração da instituição coparticipante.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO C - Aprovação do comitê de ética em pesquisa com humanos do Hospital das clínicas de Ribeirão Preto.

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

Ribeirão Preto, 11 de março de 2015

Projeto de pesquisa: "EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA VIA HIPPO/LATS EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS"

Pesquisador responsável: Maira da Costa Cacemiro e Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Ciente e de acordo:

Dr^a Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de
Ética em Pesquisa - HCFMRP-
USP

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador Técnico Científico da
Unidade de Pesquisa Clínica -
HCFMRP-USP

Campus Universitário - Monte Alegre
14049-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil/CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO D - Termo de consentimento para pacientes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Participante de Pesquisa: Paciente)

Nome	do	Paciente:
Idade: _____		
Responsável	Legal	(se
necessários): _____		
RG		do
paciente: _____		

Título do Projeto de pesquisa: “Expressão de moléculas da via Hippo em neoplasias mieloproliferativas”

Responsável Clínico pelo Projeto: Profa. Dra. Belinda Pinto Simões, Docente de Hematologia da FMRP-USP e responsável pelo ambulatório de Hematologia.

Pesquisadoras responsáveis:

Doutoranda: Maira da Costa Cacemiro (telefone: 016-99249-4720)

Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro - Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP (telefone: 016-36020657 e 011-981829203)

Prezado (a),

Convidamos você a participar de nossa pesquisa.

Policitemia vera, Trombocitemia essencial e Mielofibrose primária fazem parte das neoplasias mieloproliferativas crônicas e são doenças que apresentam sinais clínicos e laboratoriais parecidos como a proliferação descontrolada de células da medula óssea como as hemácias, plaquetas e leucócitos. As causas do aparecimento desta doença são desconhecidas. Por isso, essa pesquisa quer estudar quais são as alterações nas células do sangue que causam esse aumento do número de células e que fazem com que algumas pessoas desenvolvam essa doença.

Você foi admitido no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para tratamento da uma neoplasia mieloproliferativa crônica e, por esse motivo, o convidamos para participar de nossa pesquisa, pois o maior conhecimento sobre essa doença poderá ajudar os pesquisadores a desenvolver melhores formas de tratamento, beneficiando, no futuro, pessoas que também possam estar doentes.

Caso você aceite, você doará 30 ml de sangue (o que corresponde a duas colheres de sopa) que será colhido das veias do seu braço. As células do sangue serão usadas para estudar alguns de seus componentes chamados de proteínas e genes, que controlam a vida e o aumento dessas células. A colheita de seu sangue será realizada por profissionais de saúde com experiência, como enfermeiros, biomédicos ou farmacêuticos e com material descartável para que não haja riscos de contaminação. Os riscos dessa colheita serão mínimos, existindo uma pequena chance de você sentir um pouco de dor durante o procedimento, de aparecer inchaços roxos ou apenas inchaços em seu braço no local da colheita de sangue.

Se aceitar participar desse estudo, as células de seu sangue e seus componentes serão guardados sob a responsabilidade da Professora Fabíola Attié de Castro, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Você tem a liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja empregada nesse estudo e que seja guardada, sem que lhe cause qualquer prejuízo ou punição durante o seu tratamento no Hospital das Clínicas. Além disso, gostaríamos de saber se você autoriza que a amostra do seu sangue, além de ser usada nessa pesquisa, seja guardada para ser usada em outras pesquisas sobre a mesma doença. Caso seja necessária a realização de mais estudos, a pesquisadora lhe consultará sobre essa possibilidade se você assim desejar.

Somente os resultados da pesquisa serão divulgados, sem que seu nome apareça, ele ficará em segredo. As amostras do seu sangue e os seus dados serão também guardados em segredo pelas pesquisadoras responsáveis. As amostras e componentes de seu sangue serão identificados por números codificados e somente as pesquisadoras terão acesso. Se você quiser, podemos lhe informar sobre os resultados das pesquisas sempre que desejar, tendo a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa.

Você não terá nenhuma despesa a mais por participar dessa pesquisa e você não será pago por doar o sangue para a pesquisa. Sua doação será voluntária. No momento, a pesquisa não lhe trará nenhum benefício, mas poderá trazer benefícios no futuro, para outras pessoas que também tenha, essa doença.

Caso aceite participar desse estudo e em algum momento quiser desistir, você também terá total liberdade para isso. Você poderá recorrer às leis vigentes no Brasil para indenização de qualquer dano que lhe seja causado pelo estudo. Para a sua segurança, você receberá segunda via desse termo.

Eu, _____, RG: _____, declaro que concordo em ser voluntário e autorizo a retirada de 30mL do meu sangue para a realização da pesquisa. Fui devidamente informado em detalhes pelos responsáveis do projeto sobre os meus direitos, que o volume de sangue retirado não causará danos, que

esta pesquisa ajudará a entender o que causa o aumento do número de células do sangue nos pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas e que terei minha identidade mantida em sigilo.

Concordo em permitir que as amostras e componentes de meu sangue sejam armazenados para uso em outras pesquisas sobre as neoplasias mieloproliferativas crônicas ? (   ) SIM   (   ) NÃO.

Se sim, desejo ser consultado novamente para autorizar o uso da amostra do meu sangue em outras pesquisas com a mesma doença? (   ) SIM   (   ) NÃO.

Endereço:

_____ Telefone: _____

Nome do doador: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Eu, Maira da Costa Cacemiro, RG: 44.503.754-4, declaro que tudo o que foi exposto anteriormente é verdade e será devidamente cumprido.

Nome do pesquisador responsável pelo estudo: Maira da Costa Cacemiro

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Se o paciente não puder assinar:

Nome do representante: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Informações importantes:

Telefone do Comitê de ética da FCFRP-USP: Fone: (16) 3602-4213. Fax: (16) 3602-4892

Endereço: FCFRP-USP, Av. do Café, s/n – Campus Universitário – Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14049-903

Telefone do Comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Fone: (16) 3602-2228. Fax: (16) 3633-1144

Endereço: HCFMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3.900 - Campus Universitário - Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14.048-900

ANEXO E - Termo de consentimento para controles.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Participante de Pesquisa: Grupo Controle)

Nome	do	Participante:
Idade: _____		
Responsável	Legal	(se
necessários): _____		
RG		do
participante: _____		

Título do Projeto de pesquisa: “Expressão das moléculas da via Hippo/LATS em neoplasias mieloproliferativas crônicas”

Responsável Clínico pelo Projeto: Profa. Dra. Belinda Pinto Simões, Docente de Hematologia da FMRP-USP e responsável pelo ambulatório de Hematologia.

Pesquisadoras responsáveis:

Doutoranda: Maira da Costa Cacemiro (telefone: 016-99249-4720)

Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro - Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP (telefone: 016-36020657 e 011-981829203)

Prezado (a),

Convidamos você a participar de nossa pesquisa.

Policitemia vera, Trombocitemia essencial e Mielofibrose primária fazem parte das neoplasias mieloproliferativas crônicas e são doenças que apresentam sinais clínicos e laboratoriais parecidos como a proliferação descontrolada de células da medula óssea como as hemácias, plaquetas e leucócitos. As causas do aparecimento desta doença são desconhecidas. Por isso, essa pesquisa quer estudar quais são as alterações nas células do sangue que causam esse aumento do número de células e que fazem com que algumas pessoas desenvolvam essa doença.

Prezado doador voluntário, por não ser portador de nenhuma Neoplasias Mieloproliferativa crônica, o convidamos para participar de nossa pesquisa, para que seja integrante de nosso grupo controle (grupo de pessoas que não apresentam a doença), pois o maior conhecimento sobre ela poderá ajudar os pesquisadores a desenvolver melhores formas de tratamento, beneficiando, no futuro, pessoas que possam estar doentes.

Caso você aceite, você doará 30 ml de sangue (o que corresponde a duas colheres de sopa) que será colhido das veias do seu braço. As células do sangue serão usadas para estudar alguns de seus componentes chamados de proteínas e genes, que controlam a vida e o aumento dessas células. A colheita de seu sangue será realizada por profissionais de saúde com experiência, como enfermeiros, biomédicos ou farmacêuticos e com material descartável para que não haja riscos de contaminação. Os riscos dessa colheita serão mínimos, existindo uma pequena chance de você sentir um pouco de dor durante o procedimento, de aparecer inchaços roxos ou apenas inchaços em seu braço no local da colheita de sangue.

Se aceitar participar desse estudo, as células de seu sangue e seus componentes serão guardados sob a responsabilidade da Professora Fabíola Attié de Castro, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Você tem a liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja empregada nesse estudo e que seja guardada, sem que lhe cause qualquer prejuízo ou punição. Além disso, gostaríamos de saber se você autoriza que a amostra do seu sangue, além de ser usada nessa pesquisa, seja guardada para ser usada em outras pesquisas sobre a mesma doença). Caso seja necessária a realização de mais estudos, a pesquisadora lhe consultará sobre essa possibilidade se você assim desejar.

Somente os resultados da pesquisa serão divulgados, sem que seu nome apareça, ele ficará em segredo. As amostras do seu sangue e os seus dados serão também guardados em segredo pelas pesquisadoras responsáveis. As amostras e componentes de seu sangue serão identificados por números codificados e somente as pesquisadoras terão acesso. Se você quiser, podemos lhe informar sobre os resultados das pesquisas sempre que desejar, tendo a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa.

Você não terá nenhuma despesa a mais por participar dessa pesquisa e você não será pago por doar o sangue para a pesquisa. Sua doação será voluntária. Caso aceite participar desse estudo e em algum momento quiser desistir, você também terá total liberdade para isso. Você poderá recorrer às leis vigentes no Brasil para indenização de qualquer dano que lhe seja causado pelo estudo. Para a sua segurança, você receberá segunda via desse termo.

Eu, _____, RG: _____, declaro que concordo em ser voluntário e autorizo a retirada de 30mL do meu sangue para a realização da pesquisa. Fui devidamente informado em detalhes pelos responsáveis do projeto sobre os meus direitos, que o volume de sangue retirado não causará danos, que esta pesquisa ajudará a entender o que causa o aumento do número de células do sangue nos pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas e que terei minha identidade mantida em sigilo.

Concordo em permitir que as amostras e componentes de meu sangue sejam armazenados para uso em outras pesquisas sobre neoplasias mieloproliferativas crônicas? (   ) SIM (   ) NÃO.

Se sim, desejo ser consultado novamente para autorizar o uso da amostra do meu sangue em outras pesquisas com a mesma doença? (   ) SIM (   ) NÃO.

Endereço:

_____ Telefone: _____

Nome do doador: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Eu, Maira da Costa Cacemiro, RG:44.503.754-4, declaro que tudo o que foi exposto anteriormente é verdade e será devidamente cumprido.

Nome do pesquisador responsável pelo estudo: Maira da Costa Cacemiro

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Se o paciente não puder assinar:

Nome do representante: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Informações importantes:

Telefone do Comitê de ética da FCFRP-USP: Fone: (16) 3602-4213. Fax: (16) 3602-4892

Endereço: FCFRP-USP, Av. do Café, s/n – Campus Universitário – Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14049-903

Telefone do Comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Fone: (16) 3602-2228. Fax: (16) 3633-1144

Endereço: HCFMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3.900 - Campus Universitário - Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14.048-900

ANEXO F - Termo de consentimento para armazenamento de amostras biológicas no biorrepositório.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Armazenamento de Amostras Biológicas

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a doar uma amostra de sangue periférico para futuras pesquisas científicas. A cada nova pesquisa com esse material, o (a) Senhor (a) será procurado para receber explicações e autorizar ou não a utilização da sua amostra já armazenada.

Caso concorde, o(a) Senhor(a) doará uma amostra de sangue periférico. A coleta deste material poderá causar desconforto local (no braço puncionado) e eventual tontura leve. Esta sua amostra e os seus dados coletados serão identificados por números sequenciais (ex: SPP113), de modo que garanta seu sigilo. Após coletada, a amostra será guardada por 10 anos em um BIORREPOSITÓRIO (banco de amostras biológicas), intitulado Biorrepositório do Laboratório de Hematologia da FCFRP, localizado no laboratório de hematologia, sala multiusuários 46A-M, segundo andar do bloco M da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-RP em condições adequadas de armazenamento, sob responsabilidade da Prof.^a. Dr^a Fabíola Attié de Castro. Ao final deste tempo de armazenamento, a amostra será jogada fora.

O(a) Senhor(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato comigo nos telefones citados no final deste documento, para que eu possa suspender o armazenamento da sua amostra, que poderá ser entregue ao/à Senhor(a), se assim desejar, ou jogada fora após seu consentimento por escrito.

Caso não concorde em doar sangue periférico ou desista de permitir que se guarde esta amostra, essa decisão não lhe trará qualquer penalização ou prejuízo **do atendimento que lhe for prestado.**

A coleta deste material biológico nesse momento não trará nenhum benefício imediato para o(a) Senhor(a). Entretanto, no futuro, os dados obtidos com novas pesquisas poderão ajudar outras pessoas.

Coloco-me à disposição para lhe fornecer o resultado da pesquisa realizada com sua amostra.

Declaro que toda nova pesquisa, utilizando sua amostra biológica, será realizada somente quando o projeto for aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP.

Prof.^a Dr^a. Fabiola Attié de Castro

(16)3602-4163/ (16)98177-9222

mairacacemiro@usp.br

Consentimento do Sujeito de Pesquisa

Eu, _____, RG: _____,
residente na Rua _____ (número, bairro, cidade,
telefone / celular), aceito que minha amostra biológica de sangue (DNA, cDNA, RNA) seja
armazenada pela Prof.^a Dr^a. Fabiola Attié de Castro na Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP para fins de pesquisa científica.

Declaro estar ciente de que a previsão de guarda do material é de no máximo 10 anos.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Doador ou responsável legal