UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão de Galectinas-1 e 3 em Neoplasias Mieloproliferativas

Lívia Gonzaga Moura

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão de Galectinas-1 e 3 em Neoplasias Mieloproliferativas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para Obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Livia Gonzaga Moura

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 26/10/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2012

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moura, Livia Gonzaga

Expressão de Galectinas-1 e 3 em Neoplasias Mieloproliferativas. Ribeirão Preto. 2012.

115 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Castro, Prof. Dra. Fabíola Attie de

1. Galectina-1, 2. Galectina-3, 3. Apoptose,
4. Neoplasias Mieloproliferativas, 5. Expressão gênica.

Lívia Gonzaga Moura

Expressão de Galectinas-1 e 3 em Neoplasias Mieloproliferativas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esta dissertação aos meus pais
pelo amor imensurável, apoio constante e por
serem o exemplo da minha vida em todos os
sentidos.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pacientes por terem confiado em meu trabalho e doado as amostras para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Fabíola Attié de Castro pela oportunidade de fazer parte de seu excelente grupo de pesquisa nesses anos. Obrigada por sua generosidade, ensinamentos, carinho e amizade.

Ao Prof Dr Marcelo Dias Baruffi, por toda a ajuda, paciência e carinho comigo. Exemplo de ser humano, professor e pesquisador.

A Dr^a Simone Kashima Haddad e toda a sua equipe do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela colaboração, pela disposição de me ajudar e disponibilização de seu laboratório para realização de parte dos experimentos.

À Patrícia Palma e Camila do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela colaboração.

Aos médicos hematologistas Belinda Pinto Simões, Maria Aparecida Zanichelli, Mary Santana, Elizabeth Xisto Souto por colaborarem na seleção de pacientes e coleta das amostras de medula óssea.

Às funcionárias da FCFRP-USP e colegas Solange e Jennifer pela colaboração.

Às amigas de trabalho Luciana Ambrosio e Sandra Burin pela colaboração, apoio e pelo “socorro” nos momentos de fazer Western Blot.

À amiga Raquel Tognon Ribeiro por todos os ensinamentos e apoio com os experimentos e discussões científicas.

À amiga Aline Ferreira, minha “mãe científica”, por todos os ensinamentos, pela paciência e carinho para me ensinar.

À amiga querida Natália de Souza Nunes, por toda a ajuda nos experimentos, na busca dos pacientes e também, na vida. Amizade linda que guardarei pra sempre.

Às amigas amadas Paula e Patrícia Fiorani, Renata Granado, Mariana Bellini, Nathália Lambertini, Maiana Eid, Nadine, Rafa Masunari por me apoiarem e, mesmo longe, estarem sempre ao meu lado. Sinto saudades.

À amiga Helena Rangel Esper pela amizade, carinho, apoio e abrigo de sempre. Você mora no meu coração.

À amiga Lilian Cataldi pela paciência em me ensinar, pelo apoio e carinho com meus experimentos e comigo.

Aos velhos amigos Luiz Paulo e Júlia Weiler, Thales Albuquerque, Ricardo e Alexandre Nakasone, Camila Thiago, Andréa Rahal e Maria Gabriela Del Monaco por todos esses anos de amizade e pelo apoio constante.

Ao meu irmão, Danilo Moura, pela amizade, companheirismo, incentivo e por todas as notas musicais que deixam a minha vida com muito mais paz.

Aos meus avós Geraldo, Arcedes, América e Neirton por todo o apoio e carinho e por fazerem as comidinhas mais gostosas do mundo.

Ao meu mais antigo e novo companheiro, Rodrigo Silva de Almeida, pelo carinho, respeito, compreensão, por estar sempre ao meu lado mesmo longe, por ser uma constante alegria em minha vida.

À Deus, força que guia meu caminho e me dá apoio para nunca desanimar.

AGRADECIMENTO

Agradecimento á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida para o desenvolvimento desta pesquisa, processo número (2010/11905-6)

"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem, de repente, aprende."

João Guimarães Rosa

RESUMO

Gonzaga-Moura, Livia. **Expressão de Galectinas-1 e 3 em Neoplasias Mieloproliferativas**. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Doenças Mieloproliferativas Crônicas são desordens hematológicas malignas caracterizadas pela alteração na célula-tronco hematopoética e independência ou hipersensibilidade dos progenitores hematopoéticos a citocinas. Em 2008 a OMS renomeou esse grupo como Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs), no qual estão inclusas as entidades nosológicas Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP), doenças alvo desse estudo. Apesar dos avanços no diagnóstico das NMPs e nos mecanismos envolvidos com a fisiopatologia dessas doenças, sua patogênese permanece desconhecida. Alterações na maquinaria apoptótica parecem estar envolvidas em na fisiopatologia das NMP e por isso a compreensão dos mecanismos de regulação da apoptose e a interferência das galectinas-1 e 3 nesse processo, em pacientes com NMPs, é relevante para a busca de novos alvos terapêuticos. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar em leucócitos de sangue periférico e células tronco hematopoéticas CD34⁺ de medula óssea dos pacientes com PV, TE e MFP os níveis de expressão das *LGALS1* e *LGALS3* e a concentração de galectina-3 plasmática. Foram determinadas as correlações dos níveis de expressão de *LGALS1* e *LGALS3* e da concentração da galectina-3 plasmática com os níveis de expressão do RNAm das moléculas reguladoras da apoptose e com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes como a concentração de hemoglobina, percentagem de hematócrito, porcentagem de alelos mutados JAK2V617F, contagem de leucócitos e esplenomegalia. A expressão de *LGALS1* estava diminuída em células CD34⁺ em PV e MFP e em leucócitos de sangue periférico de pacientes com MFP. Os pacientes de TE apresentaram aumento na expressão de *LGALS3* em leucócitos de sangue periférico e alta concentração de galectina-3 no plasma. Houve correlação entre os níveis de expressão de *LGALS1* e a porcentagem de alelos mutados e a contagem de leucócitos, em pacientes com PV. Foi detectada a correlação entre os níveis de expressão de *LGALS3* a porcentagem de alelos mutados e o tamanho do baço, em pacientes com MFP. Com relação aos genes reguladores da apoptose, foram observadas correlações entre os níveis de expressão de *LGALS1* e *BCL-2* em células CD34⁺ de pacientes PV e entre *LGALS3* e *A1*, *MCL-1*, *BAX* e *C-FLIP* em leucócitos de de pacientes com TE. Os resultados obtidos indicam que as NPM apresentam expressão diferencial de *LGALS1* e *LGALS3* e sugerem a associação entre a expressão de galectinas e o *status* da mutação JAK2V617F, principalmente em pacientes com MFP.

Palavras Chave: 1. Neoplasias Mieloproliferativas. 2. Galectinas-1 e 3. 3. Apoptose. 4. Expressão Gênica.

ABSTRACT

Gonzaga-Moura, Lívia. **Galectin-1 and 3 expression in Myeloproliferative Neoplasms**. 2012. 115f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Chronic myeloproliferative diseases are haematological malignant disorders characterized by the presence of an altered haematopoietic stem cell and independence or hypersensitivity of their hematopoietic progenitors to cytokines. In 2008, WHO renamed this group of diseases as Myeloproliferative Neoplasms (MPN) in which is included Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (PMF). There have been advances concerning the knowledge about the mechanisms involved in MPN pathophysiology, however their pathogenesis remains unknown. Deregulation in apoptotic machinery seems to be involved in MPN pathophysiology. Fully understanding of apoptotic machinery and the influence of galectin-1 and 3 in this process in NMP patients might unveil novel targets for manipulation. The aims of the present study were to evaluate in leukocytes and CD34⁺ hematopoietic stem cells from PV, ET and PMF patients the *LGALS1* and *LGALS3* expression levels, the Galectin-3 plasma levels and to correlate *LGALS1* and *LGALS3* expression levels with galectin-3 plasma levels, apoptosis-related genes expression, JAK2 mutation *status* and clinic-laboratorial parameters. PV and PMF patients showed decreased expression levels of *LGALS1* in CD34⁺ cells and also decreased *LGALS1* expression levels in PMF leukocytes. ET patients presented an increased expression level of galectin-3 in leukocytes and plasma. We detected the correlations between *LGALS3* gene expression with JAK2 allele burden and with leukocytes number in PV patients. We also observed in PMF patients the correlation between *LGALS3* expression levels with JAK2 allele burden and spleen size. We also detected the correlation between *LGALS1* expression levels *BCL-2* gene expression in PV CD34⁺ HSC cells and between *LGALS3* expression and *A1*, *MCL-1*, *BAX* and *C-FLIP* gene expression in TE leukocytes. Taken together, the results suggest the *LGALS1* and *LGALS3* differential expression in NMP and the relation between JAK2V617F *status* with galectins expression, especially in PMF patients.

Keywords: 1. Myeloproliferative Neoplasms. 2. Galectin-1 and 3. 3. Apoptosis. 4. Gene Expression

RESUMEN

Gonzaga-Moura, Livia. **La expresión de las galectinas-1 y 3 en Neoplasias Mieloproliferativas**. 2012. 115F. Tesis (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Las enfermedades crónicas mieloproliferativas son enfermedades malignas hematológicas caracterizadas por alteraciones en las células madre hematopoyéticas multipotentes o la independencia y la hipersensibilidad de progenitores hematopoyéticos a citoquinas. En 2008, la OMS rebautizó este grupo de Neoplasia Mieloproliferativa como (NMP) que están presentes en la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis Primaria (MFP), este estudio se centró en las enfermedades. Aunque en los últimos años se han producido avances en el diagnóstico de la NMPs y los mecanismos implicados en la fisiopatología de estas enfermedades, su patogénesis es aún desconocido. Las alteraciones en la maquinaria apoptótica parecen estar implicados en su fisiopatología lo que la comprensión de los mecanismos de regulación de la apoptosis y la interferencia de las galectinas-1 y 3 en este proceso, en pacientes con NMPs, es relevante para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. En este contexto, los objetivos de este estudio fueron evaluar, en los leucocitos de sangre periférica y médula ósea CD34⁺ de los pacientes con PV, TE y MFP: (1) los niveles de expresión de *LGALS1* y *LGALS3* (2) La concentración de la galectina-3 en plasma; (3) Correlación entre los niveles de expresión de *LGALS3* y *LGALS1* y la cuantificación de la galectina-3 en los niveles plasmáticos de la expresión del ARNm de las moléculas pro-y anti-apoptóticas de la familia de receptores de muerte Bcl-2, (4) Correlación de niveles de expresión de *LGALS3* y *LGALS1* y la concentración plasmática de la galectina-3 con los datos clínicos y de laboratorio de pacientes: hemoglobina, hematocrito, el porcentaje de mutación JAK2V617F, recuento de leucocitos y un agrandamiento del bazo. Los pacientes MFP y PV han disminución de la expresión de *LGALS1* en células CD34⁺ y también a disminuir en los leucocitos de sangre periférica de pacientes con MFP. TE pacientes mostraron incremento en la expresión de *LGALS3* en leucocitos de sangre periférica y también altas concentraciones de galectina-3 en plasma. Observamos la correlación entre los niveles de expresión de *LGALS1* y el porcentaje de alelos mutados y recuento de leucocitos en pacientes con PV. También se observó una correlación entre los niveles de expresión de *LGALS3* el porcentaje de alelos mutados y el bazo agrandado en pacientes con MFP. Con respecto a los genes que regulan la apoptosis obtenido correlaciones entre los niveles de expresión de *LGALS1* y *BCL 2* en las células CD34⁺ de pacientes con PV y entre *LGALS3* y *A1*, *MCL-1*, *BAX* y *C-FLIP* en los leucocitos de sangre periférica de pacientes con TE. Los resultados indican que la expresión diferencial de NPM tiene *LGALS1* y *LGALS3* y sugieren una asociación entre la expresión de las galectinas y el estado JAK2V617F mutación, especialmente en pacientes con MFP.

Palabras clave: 1. Neoplasias mieloproliferativas. 2. Galectinas-1 y 3. 3. Apoptose. 4. Gene Expression.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características demográficas dos pacientes com Policitemia Vera.....	24
Tabela 2- Características demográficas dos pacientes com Trombocitemia Essencial.....	25
Tabela 3- Características demográficas dos pacientes com Mielofibrose Primária	26
Tabela 4- Características demográficas dos controles de medula óssea.....	27
Tabela 5- Características demográficas dos controles de sangue periférico	28
Tabela 6- Sequências dos oligonucleotídeos empregados na quantificação da expressão dos genes <i>LGALS1</i> , <i>LGALS3</i> , genes endógenos e reguladores da apoptose celular.....	34
Tabela 7- Número de células CD34 ⁺ coletadas de pacientes com Policitemia Vera e porcentagem (%) de pureza	39
Tabela 8- Número de células CD34 ⁺ coletadas de pacientes com Trombocitemia Essencial e porcentagem (%) de pureza	40
Tabela 9- Número de células CD34 ⁺ coletadas de pacientes com Mielofibrose Primária e porcentagem (%) de pureza	42
Tabela 10- Número de células CD34 ⁺ coletadas do grupo controle e porcentagem (%) de pureza.....	43
Tabela 11- Dados da detecção da mutação JAK2V617F e porcentagem (%) de alelos mutados em pacientes com Policitemia Vera	44
Tabela 12- Dados da detecção da mutação JAK2V617F e porcentagem (%) de alelos mutados em pacientes com Trombocitemia Essencial	45
Tabela 13- Dados da detecção da mutação JAK2V617F e porcentagem (%) de alelos mutados em pacientes com Mielofibrose Primária	46
Tabela 14- Hematócrito, concentração de Hemoglobina, contagem de leucócitos e de plaquetas dos pacientes com Policitemia Vera.....	48
Tabela 15- Hematócrito, Concentração de Hemoglobina, contagem de leucócitos, de plaquetas e tamanho do baço dos pacientes com Trombocitemia Essencial	49
Tabela 16- Hematócrito, Concentração de Hemoglobina, contagem de leucócitos, plaquetas e tamanho do baço dos pacientes com Mielofibrose Essencial	50
Tabela 17- Dados de correlação entre o nível de expressão gênica de <i>LGALS1</i> e genes reguladores da apoptose em leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺	58
Tabela 18- Dados de correlação entre o nível de expressão gênica de <i>LGALS3</i> e genes reguladores da apoptose em leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺	64

Tabela 19- Resultados dos testes de correlação entre dados de expressão gênica de <i>LGALS1</i> e parâmetros hematológicos e porcentagem de alelos mutados	65
Tabela 20- Resultados dos testes de correlação entre dados de expressão gênica de <i>LGALS3</i> e parâmetros hematológicos e porcentagem de alelos mutados	68
Tabela 21- Pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária, cujos plasmas foram utilizados nos experimentos de Elisa e respectivas concentrações de galectina-3	71
Tabela 22- Resultados dos testes de correlação entre as concentrações de galectina-3 plasmáticas e os níveis de expressão de genes reguladores da apoptose em leucócitos de sangue periférico.....	75
Tabela 23- Resultados dos testes de correlação entre concentrações de galectina-3 plasmática e parâmetros hematológicos e porcentagem de alelos mutados	76
Tabela 24- Dados de expressão gênica de <i>LSGAL1</i> e <i>LSGAL3</i> , da detecção da proteína galectina-1 e galectina-3 por Western Blot e da concentração plasmática de galectina-3 por ELISA.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Via de sinalização de JAK2 e a mutação V617F.....	8
Figura 2- Localização da mutação V617F na proteína Janus Kinase 2 (JAK2).....	9
Figura 3- Sítio de reconhecimento de carboidratos da galectina. Cinco sub-regiões A, B, C, D e do CRD da galectina, com seus resíduos de aminoácidos, interagindo com o carboidrato Gal β 1-4Glu.....	11
Figura 4- Tipos de estrutura das galectinas e formação de redes entre as Galectinas e os carboidratos multivalentes.....	12
Figura 5- Exemplo de gel de agarose 1% com RNA extraídos de sete amostras de sangue periférico de pacientes e controles. Observa-se a visualização das bandas 28S, 18S e 5S do RNA.....	33
Figura 6- Expressão de <i>LGALS1</i> em leucócitos de sangue periférico e em células CD34 ⁺ de pacientes com PV, TE e MFP. <i>LGALS1</i> apresenta-se <i>hipoexpressa</i> em leucócitos de sangue periférico de pacientes com MFP e em células CD34 ⁺ de pacientes com PV e com MFP em relação ao grupo controle. <i>LGALS1</i> apresenta-se mais expressa em células CD34 ⁺ de pacientes com TE quando comparado a expressão em pacientes com PV e MFP ..	52
Figura 7- Expressão de <i>LGALS3</i> em leucócitos de sangue periférico e em células CD34 ⁺ de pacientes com PV, TE e MFP.....	53
Figura 8- Correlação entre os valores de expressão de <i>LGALS1</i> e a expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos e células CD34 ⁺ dos pacientes com PV	55
Figura 9- Correlação entre os valores de expressão de <i>LGALS1</i> e a expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos e células CD34 ⁺ dos pacientes com TE	57
Figura 10- Correlação entre os valores de expressão de <i>LGALS3</i> e a expressão dos genes envolvidos na apoptose em células CD34 ⁺ dos pacientes com MFP	59
Figura 11- Correlação entre os valores de expressão de <i>LGALS3</i> e a expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos e células CD34 ⁺ dos pacientes com TE	61
Figura 12- Correlação entre os valores de expressão de <i>LGALS3</i> e a expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos dos pacientes com MFP	63
Figura 13- Correlação entre a contagem de leucócitos e os níveis de expressão de <i>LGALS1</i> em leucócitos de pacientes com PV	65
Figura 14- Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e os níveis de expressão de <i>LGALS1</i> em leucócitos de pacientes com PV	66
Figura 15- Correlação entre os parâmetros hematológicos e os níveis de expressão de <i>LGALS3</i> em leucócitos de pacientes com TE.....	67

Figura 16- Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e os níveis de expressão de <i>LGALS3</i> em leucócitos de pacientes com MFP	67
Figura 17- Expressão de <i>LGALS1</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com MFP, somatória do grupo de pacientes com TE e MFP e de todos os pacientes que foram separados conforme o <i>status</i> da mutação JAK2. <i>LGALS1</i> apresenta-se <i>hiperexpressa</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com MFP JAK2V617F negativos e em células CD34 ⁺ do grupo total de pacientes negativos para a mutação JAK2V617F.	69
Figura 18- Expressão de <i>LGALS3</i> em leucócitos de pacientes com MFP e em leucócitos de todos os pacientes separados em grupos conforme o <i>status</i> da mutação JAK2. <i>LGALS3</i> apresenta-se <i>hiperexpressa</i> em leucócitos de pacientes com MFP JAK2V617F negativos e em leucócitos de pacientes do grupo total de pacientes JAK2V617F negativos.....	70
Figura 19- Quantificação de galectina-3 plasmática em pacientes com PV, TE e MFP. Pacientes com TE apresentam maior concentração de galectina-3 no plasma do que o grupo controle.....	73
Figura 20- Correlação entre as concentrações de galectina-3 plasmática e os valores de expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos e células CD34 ⁺ dos pacientes com PV e TE	74
Figura 21- Detecção da proteína Galectina-3 em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera	78
Figura 22- Detecção da proteína Galectina-3 em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial	78
Figura 23- Detecção da proteína Galectina-3 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose Primária.....	78
Figura 24- Detecção da proteína Galectina-1 em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera	80
Figura 25- Detecção da proteína Galectina-1 em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial	80
Figura 26- Detecção da proteína Galectina-1 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose Primária.....	80
Figura 30- Participação de galectina-1 na maquinaria apoptótica.....	89
Figura 31- Participação de galectina-1 na maquinaria apoptótica.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS –	ácido acetilsalicílico
ACD –	solução de ácido cítrico, citrato, dextrose
AIF –	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
AKT –	<i>Serine/threonine-specific protein kinase</i>
APAF-1 –	<i>Apoptosis protease-activator factor 1</i>
AI –	<i>bcl-2 related protein AI</i>
BAK–	<i>bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX –	<i>bcl-2 associated X protein</i>
BCL-X _L –	<i>bcl-2 related gene</i>
BCL-W–	<i>Antiapoptotic bcl-2 family member</i>
BCL-2 –	<i>B-cell CLL / lymphoma 2</i>
BCR-ABL –	<i>break cluster region – Abelson</i>
BFU-E –	“Burst” Unidade formadora eritróide
BID –	<i>BH3-interacting domain agonist</i>
BIK –	<i>bcl-2-interacting killer</i>
BIM –	<i>bcl-2 interacting mediator</i>
BMF –	<i>bcl-2-modifying factor</i>
CD7 –	<i>Cluster of Differentiation 7</i>
c-DNA –	<i>complementary DNA synthesized for reverse transcriptase</i>
C-FLIP–	<i>Like caspase-8 (FLICE)-inhibitory proteins</i>
C-IAP-1 –	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 3, apoptosis inhibitor 1</i>
C-IAP-2 –	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 3, apoptosis inhibitor 2</i>
c-MPL –	receptor de trombopoetina
CRD –	Domínio de reconhecimento de carboidrato
Ct –	<i>Threshold cycle</i>
del(13q) –	deleção no braço longo do cromossomo 13
NMP –	Neoplasia Mieloproliferativa
DHL –	Enzima lactato desidrogenase
DNA –	Ácido desoxirribonucléico
DSM –	Doença sistêmica dos mastócitos
DR4 –	<i>Death receptor 4 (TRAIL receptor 1)</i>
DR5 –	<i>Death receptor 5 (TRAIL receptor 2)</i>

EDTA –	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA –	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO –	eritropoetina
EPO-R –	receptor de eritropoetina
ERK –	<i>Extracellular sinal-regulated kinases</i>
FAPESP –	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<i>FAS</i> –	Receptor de morte
<i>FAIM</i> –	<i>Fa apoptotic inhibitory molecule</i>
<i>FAS-L</i> –	Fas ligante
FCFRP-USP –	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP
FITC –	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKBP59 –	<i>protein associated with the heat shock protein hsp90</i>
Gal-1 –	proteína galectina-1
Gal-3 –	proteína galectina-3
GAPDH –	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GCSF-R –	<i>granulocyte colony-stimulating factor receptor</i>
GM-SCF –	Fator estimulador de colônia granulocítico-monocítico
Hb –	Hemoglobina
HCFMRP-USP –	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP
Ht –	Hematócrito
IDV –	<i>Integrated density value</i>
IAPs –	<i>Inhibitory apoptosis proteins</i>
<i>LGALS1</i> –	<i>gene de galectina-1 humana</i>
<i>LGALS3</i> –	<i>gene de galectina-3 humana</i>
IL-3 –	Interleucina 3
JAK –	<i>Tyrosine kinases of the Janus kinase family</i>
JAK1 –	<i>Janus Kinase 1</i>
JAK2 –	<i>Janus Kinase 2</i>
JAK3 –	<i>Janus Kinase 3</i>
JAK2 V617F –	<i>Janus Kinase 2</i> mutada no aminoácido 617, troca de Valina por Fenilalanina
JAK-STAT –	signaling pathway
JH1 –	<i>JAK homology 1</i>
JH2 –	<i>JAK homology 2</i>
kDa –	Kilodaltons

LLC –	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA –	Leucemia Mielóide Aguda
LMC –	Leucemia mielóide crônica
LMCA –	Leucemia mielóide crônica atípica
LMMC –	Leucemia mielomonocítica crônica
LNC –	Leucemia neutrofílica crônica
LPS –	lipopolissacarídeo
MAPK –	<i>Mitogen-activating protein kinase</i>
<i>MCL-1</i> –	<i>Myeloid cell leukemia</i>
MFP –	Mielofibrose Primária
MO –	Medula óssea
MOC –	Medula óssea do controle
MOP –	Medula óssea de paciente
mTOR –	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NMPC –	Neoplasia mieloproliferativa crônica
<i>NOXA</i> –	<i>Proapoptotic BH3-only member of bcl-2</i>
OMS –	Organização Mundial da Saúde
PBS –	<i>Phosphate buffer solution</i>
PCR –	Reação em cadeia da polimerase
Ph –	cromossomo Philadéphia
PI3K –	<i>Phosphoinositol - 3 kinase</i>
PRV-1 –	Policitemia Rubra Vera-1
<i>PUMA</i> –	<i>p53-up-regulated modulator of apoptosis</i>
PV –	Policitemia vera
PVDF –	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RNA –	Ácido ribonucléico
RNA _m –	RNA mensageiro
SCF –	<i>stem cell factor</i>
SDS-PAGE –	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SHE/LEC –	Síndrome Hipereosinofílica/Leucemia Eosinofílica Crônica
SMAC –	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SOCs1 –	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
SOCs3 –	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
SP –	Sangue periférico
SPC –	Sangue periférico do controle

STAT –	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
STAT 5 –	<i>Signal transducers and activators of transcription 5</i>
TA –	Temperatura de anelamento do primer
TCLE –	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE –	Trombocitemia essencial
TGF β -1 –	<i>transforming growth factor beta-1</i>
TPO –	Trombopoetina
TpoR –	Receptor de Trombopoetina
<i>TRAIL</i> –	<i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i>
TYK2 –	Tirosina quinase 2
USP –	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
I. INTRODUÇÃO.....	2
I.1. Neoplasias mieloproliferativas	2
I.1.1. Classificação e Características Gerais.....	2
I.1.2. Patogênese das NMP	4
I.2. Galectinas	10
I.3. Galectinas e neoplasias.....	15
II. OBJETIVOS	19
III. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	21
III.1. Casuística.....	21
III.2. Critérios de diagnóstico das NMPs, segundo a OMS.....	22
III.3. Material e Métodos.....	30
III.3.1. Obtenção dos leucócitos e células CD34 ⁺ hematopoéticas	30
III.3.2. Determinação do Hemograma dos Pacientes	30
III.3.3. Detecção da mutação JAK2 V617F no sangue periférico	31
III.3.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real	32
III.3.5 Detecção das galectinas 1 e 3 por <i>western blot</i>	35
III.3.6. Detecção da galectina-3 plasmática por ELISA	35
III.3.7. Análise Estatística.....	36
IV. RESULTADOS.....	38
IV.1. Determinação da pureza das células CD34 ⁺ por citometria de fluxo.....	38
IV.2. Detecção da mutação JAK2V617F e cálculo da porcentagem de alelos mutados em leucócitos de sangue periférico.....	38
IV.3. Parâmetros hematológicos das amostras de sangue periférico dos pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária	47

IV.4. Quantificação da expressão de <i>LGALS1</i> em leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺ de pacientes com PV, TE e MFP	51
IV.5. Expressão de <i>LGALS3</i> em leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺ de pacientes com PV, TE e MFP	52
IV.6. Correlação dos níveis de expressão de <i>LGALS1</i> de leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com PV	54
IV.7. Correlação dos níveis de expressão de <i>LGALS1</i> de leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com TE	56
IV.8. Correlação dos níveis de expressão de <i>LGALS1</i> de leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com MFP ...	56
IV.9. Correlação dos níveis de expressão de <i>LGALS3</i> de leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com PV	58
IV.10. Correlação dos níveis de expressão de <i>LGALS3</i> de leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com TE	60
IV.11. Correlação dos níveis de expressão de <i>LGALS3</i> de leucócitos de sangue periférico e células CD34 ⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com MFP ...	62
IV.12. Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão de <i>LGALS1</i> de leucócitos de sangue periférico em pacientes PV, TE e MFP	64
IV.13. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e níveis de expressão de <i>LGALS1</i> em leucócitos de sangue periférico e em células CD34 ⁺ de pacientes PV, TE e MFP	66
IV.14. Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão de <i>LGALS3</i> de leucócitos de sangue periférico em pacientes PV, TE e MFP	66
IV.15. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e os níveis de expressão de <i>LGALS3</i> em leucócitos de sangue periférico e em células CD34 ⁺ de pacientes PV, TE e MFP	67
IV.16. Expressão de <i>LGALS1</i> em relação presença da mutação JAK2V617F	68
IV.17. Expressão de <i>LGALS3</i> em relação presença da mutação JAK2V617F	69
IV.18. Concentração plasmática de galectina-3 em pacientes com PV, TE e MFP	70
IV.19. Correlação entre as concentrações de galectina-3 plasmática e os níveis de expressão de genes envolvidos na apoptose em leucócitos de sangue periférico e em células CD34 ⁺ de pacientes com PV, TE e MFP	73
IV.20. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e as concentrações de galectina-3 plasmática de pacientes PV, TE e MFP	75
IV.21. Correlação entre os parâmetros hematológicos e as concentrações de galectina-3 plasmática em pacientes com PV, TE e MFP	76
IV.22. Quantificação de galectina-3 plasmática de pacientes com PV, TE e MFP status da mutação JAK2V617F	77
IV.23. Análise da expressão protéica de galectina-3 em leucócitos do sangue periférico de pacientes PV, TE e MFP por <i>Western Blot</i>	77
IV.24. Análise da expressão protéica de galectina-1 em leucócitos do sangue periférico de pacientes com PV, TE e MFP por <i>Western Blot</i>	79
IV.25. Compilação dos principais resultados	81

V. DISCUSSÃO	83
VI. CONCLUSÕES	100
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS	114
ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	114
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	115

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Neoplasias mieloproliferativas

I.1.1. Classificação e Características Gerais

As doenças mieloproliferativas crônicas são neoplasias hematológicas que compartilham características como alteração na célula-tronco hematopoética multipotente, aumento na proliferação de células sanguíneas maduras diferenciadas de uma ou mais linhagens celulares na ausência de estímulos definidos, medula óssea (MO) hipercelular, hematopoese extramedular da célula maligna, predisposição a trombose e potencial progressão para leucemia mielóide aguda (LMA) ou fibrose medular (DELHOMMEAU *et al.*, 2007; SPANOUDAKIS *et al.*, 2009).

As DMPCs foram classificadas em 2008 em dois grupos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e foram renomeadas em Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs). Nesse grupo de doenças está contido as NMPs clássicas que são a Leucemia Mielóide Crônica (LMC), Policitemia Vera (PV) Trombocitemia Essencial (TE) e a Mielofibrose Primária (MFP) e as Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs) menos frequentes que são a Leucemia Neutrofília Crônica (LNC), Síndrome Hipereosinofílica/Leucemia Eosinofílica Crônica (SHE/LEC). Outro grupo seria as NMP não classificadas que apresentam características intermediárias entre as NMPs e síndromes mielodisplásicas, no qual estão inclusas a Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC), a Doença Sistêmica dos Mastócitos (DSM) e a Leucemia Mielóide Crônica Atípica (LMCA) (WADLEIGH & TEFERRI, 2010).

Esse estudo investiga a fisiopatologia das NMP cromossomo Philadelphia negativas (NMP Ph-) mais prevalentes, ou seja, a Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária (TEFFERI *et al.*, 2007).

A PV caracteriza-se por apresentar acúmulo de eritrócitos, leucócitos e plaquetas morfológicamente normais no sangue periférico (SP) e seus precursores na ausência de estímulo definido, sendo, portanto, considerada uma doença mieloacumulativa (SPIVAK, 2002). A incidência de PV é de 1,9 casos em 100.00 habitantes/ano (KIM *et al.*, 2012).

Pacientes com PV podem ser tratados com ácido acetilsalicílico (AAS) na dose de 100-300mg/dia; quimioterapia citoreductiva com hidroxiuréia para casos de pacientes com eventos trombóticos ou hemorrágicos prévios (RUGGERI *et al.*, 2010) e sangrias terapêuticas visando diminuição do hematócrito (abaixo de 45%).

A Trombocitemia essencial apresenta características como aumento permanente da contagem de plaquetas (maior que 450×10^9 plaquetas/L), ausência de leucocitose ou eritrocitose, medula com megacariócitos hiperplásicos e ausência de infiltração leucêmica e tendência ao desenvolvimento de trombose e sangramentos (TEFFERI, *et al.*, 2007). A incidência anual de TE é de 0,59 a 2,53 casos em 100.000 habitantes e tem prevalência de 30 casos em 100.000 indivíduos (JOHANSSON, 2006).

No tratamento de TE o AAS em baixas dosagens, a terapia citoreductiva com hidroxiuréia (hidroxicarbamida) e o anagrelide são utilizados. As terapias empregadas para PV e TE não são curativas, apenas prolongam a sobrevida e diminuem a morbidade da doença (BEER *et al.*, 2009).

A Mielofibrose tem como principal característica a fibrose medular, além de esplenomegalia, leucoeritroblastose, pancitopenia, hematopoese extramedular, aumento da densidade microvascular da medula e mobilização de células progenitoras hematopoéticas. Essa desordem hematológica pode ser primária ou pós-PV ou pós-TE. A sobrevida desses pacientes normalmente não ultrapassa cinco anos (HOFFMAN & RAVANDI-KASHANI, 2005). O tratamento da MF também é paliativo e a intervenção terapêutica visa melhora dos sintomas utilizando quimioterápicos, drogas imunomoduladoras e modificadores de respostas

biológicas. As transfusões sanguíneas são de fundamental importância para o tratamento da anemia e da trombocitopenia. Até o momento, somente o transplante de medula óssea é capaz de promover sua cura (HOFFMAN & RONDELLI, 2007).

As bases moleculares das NMP são desconhecidas, mas conforme o modelo da LMC acredita-se que a atividade de uma tirosina-quinase constitutiva possa estar envolvida na fisiopatologia dessas doenças (JAMES, *et al.*, 2005).

I.1.2. Patogênese das NMP

Pouco se conhece sobre a patogênese da PV, TE e MFP. Com efeito, raros marcadores de prognóstico e diagnóstico foram descritos. A PV e a TE parecem representar estágios iniciais de NMPs que evolui para MFP ou uma leucemia aguda.

A anormalidade central na PV é a produção de eritrócitos independente de eritropoetina (EPO), o hormônio que normalmente regula a eritropoese. Na PV, os níveis de EPO plasmáticos são baixos e os progenitores eritróides da medula óssea formam colônias EPO-independentes em ensaios *in vitro* em culturas semi-sólidas (CORREA, *et al.*, 1994). A expressão de receptores de EPO e sua habilidade de ligar-se à EPO são normais (GREEN, *et al.*, 1996). As células precursoras hematopoéticas (BFU-E) da PV são hipersensíveis a diversos fatores de crescimento, incluindo a interleucina-3 (IL-3), o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e a trombopoetina (TPO) (DAÍ, *et al.*, 2005), sugerindo que a via de transdução de sinais nessas células esteja alterada. A incapacidade para transduzir o sinal da TPO deve-se provavelmente a uma redução ou ausência completa do seu receptor, o c-mpl (MOLITERNO, *et al.*, 1998). A expansão eritróide na ausência de EPO exógena e a incapacidade de responder à TPO também podem ser observadas em pacientes com TE e MFP, mas não em indivíduos saudáveis.

Silva e colaboradores (1998) relataram que precursores eritróides de pacientes com PV expressavam a proteína anti-apoptótica *BCL-X_L* em proporção muito maior que precursores presentes em indivíduos normais, o que culminaria com a resistência das células precursoras à apoptose.

Na TE os mecanismos que conduzem à trombocitose são pouco conhecidos. As alterações citogenéticas são raras, ocorrendo apenas em 5 a 10% dos casos a del (13q) e trissomia dos cromossomos 8 ou 9 (BENCH *et al.*, 2005). A trombocitose parece ser originada do aumento de produção de plaquetas pelos megacariócitos e em parte pelo aumento da vida média de megacariócitos e plaquetas (VAN ETEN & SHANNON, 2004). O *pool* de progenitores megacariocíticos do sangue periférico e da medula óssea dos pacientes com TE proliferam *in vitro* sem estímulo e mostram-se extremamente sensíveis à ação de citocinas como IL-3 e TPO, mas não GM-CSF e TGF- β 1. Esses dados indicam que os progenitores megacariocíticos sejam resistentes aos inibidores da megacariocitopoese, mas hipersensíveis aos fatores estimuladores produzidos pelo estroma medular (KAWASAKI, *et al.*, 2001). Na TE os níveis séricos de TPO são normais ou ligeiramente aumentados e não foram descritas mutações no gene da TPO ou de seu receptor (c-mpl) (TEFFERI & MURPHY, 2001). Além disso, a expressão dos receptores c-mpl está reduzida em parte dos pacientes com TE e sua ativação não é constitutiva nesses pacientes. Esses dados apontam, portanto, para ausência de associação entre trombocitose e os níveis de trombopoetina e de seu receptor. Por outro lado, ZHANG e colaboradores (2004), avaliando a expressão de Bcl-*x_L* durante a diferenciação megacariocítica em pacientes com TE, constataram que a expressão da proteína Bcl-*x_L* está diminuída precocemente em culturas de megacariócitos *in vitro*, na presença de TPO. Esse dado sugere que a desregulação desta expressão poderia explicar, ao menos em parte, a superprodução e diferenciação de plaquetas, já que Bcl-*x_L* é essencial para a megacariocitopoese.

A MFP é uma NMP caracterizada pela expansão clonal da célula tronco pluripotente e pela presença de uma fibrose medular precedida por uma fase hipercelular. As células precursoras eritrocíticas e megacariocíticas dos pacientes proliferam *in vitro* também na ausência de EPO e TPO exógenos, como verificado nos pacientes com PV e TE (VARDIMAN, *et al.*, 2002). Além disso, os megacariócitos se apresentam aos grupos na MO e ocorre hiperplasia das três linhagens mielóides (TEFERRI, 2012). Algumas hipóteses tentam desvendar a origem da NMPs, mas nenhuma foi confirmada. A mais aceita é a de que a doença surge como resposta da célula-tronco a um estímulo desconhecido e que a proliferação dos fibroblastos gerando fibrose seria um evento secundário à doença primária (HOFFMAN & RAVANDI-KASHANI, 2005).

De fato, pacientes com MFP apresentam, sem causa aparente, 340 vezes mais células CD34⁺ circulantes quando comparados aos indivíduos saudáveis e 30 vezes mais do que pacientes com PV e TE. As células CD34⁺ nesses pacientes são ativadas por estímulo desconhecido e liberadas precocemente da MO para o SP, por incapacidade da MO retê-las. Além disso, pacientes com MFP apresentam número elevado de progenitores megacariocíticos na MO independentes de TPO, que expressam altos níveis do gene FKBP59 (imunofilina). Esse gene exerce um efeito anti-apoptótico inibindo a atividade da calcineurina, o que resultaria no aumento da sobrevivência e expansão dos progenitores megacariocíticos e ao mesmo tempo explicaria o acúmulo dos megacariócitos na MO. O estroma medular e os megacariócitos com alta expressão de imunofilina secretam o fator de crescimento derivado das plaquetas, o fator de crescimento tumoral- β e fator de crescimento epidermal. Esses compostos promovem a expansão de fibroblastos na MO e mielofibrose (HOFFMAN & RAVANDI-KASHANI, 2005). Esses dados foram confirmados em modelos animais e outros fatores produzidos por megacariócitos ou plaquetas associados a mielofibrose foram descritos (YAN & SHI, 1996).

Níveis aumentados de RNAm do receptor de superfície Policitemia Rubra Vera-1 (*PVR-1*) têm sido demonstrados em granulócitos da maioria dos pacientes com PV e TE, mas não em granulócitos de indivíduos normais ou com condições reativas (TEMERINAC, *et al.*, 2000). Kralovics e colaboradores (2005) relataram o aumento do RNAm de PRV-1 em 91% de 23 pacientes com PV e 67% de 15 pacientes com TE. Este receptor é um membro da família de receptores uPAR/CD59 que tem diversas funções, tais como interagir com ou ativar a tirosina quinase JAK2, e conseqüentemente a via JAK / STAT (HOFFMAN & RAVANDI-KASHANI, 2005).

A etiologia, evolução e fisiopatologia da PV, TE e MFP ainda não estão esclarecidas. Entretanto, um fato marcante para os estudos dessas entidades nosológicas foi a descrição, em 2005, da mutação V617F no gene da tirosina-quinase Janus kinase 2 (JAK2) durante o Terceiro Congresso Internacional sobre Síndromes Mieloproliferativas e Mielodisplásicas (Third International Congress on Mieloproliferative and Myelodysplastic Syndromes) (SILVER, *et al.*, 2007). A descrição dessa mutação levou a alterações e reavaliações nos critérios de diagnósticos, fazendo com que a presença da mutação V617F seja considerada um critério maior no estabelecimento do diagnóstico dessas doenças (TEFERRI, *et al.*, 2009).

A família das proteínas Janus Kinase (JAK) compreende quatro quinases (JAK1, 2,3 e TYK2) que se ligam aos receptores de citocina no domínio citosólico. As JAK quinases possuem dois domínios altamente homólogos na porção carboxi terminal: um domínio com atividade quinase (JH1, JAK *homology*) e um domínio pseudoquinase inativo (JH2). O domínio JH2 é um regulador negativo da atividade quinase de JH1.

JAK2 possui papel importante na via de sinalização para receptores de citocinas nas células mielóides, por meio da ligação a três receptores mielóides homodiméricos (EPO-R, MPL ou TPO-R e GCSF-R) (VAINCHENKER *et al.*, 2011). (Figura 1)

Figura 1: Via de sinalização de JAK-2 e a mutação V617F. Adaptado de LEVINE, 2007.

A mutação pontual (V617F) foi identificada em 97% de 73 pacientes com PV, 57% de 51 pacientes com TE (BAXTER *et al.*, 2005; JAMES *et al.*, 2005) e 50% de 16 pacientes com MFP. A mutação JAK2V617F é uma mutação pontual caracterizada pela troca de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 1849 do cDNA no éxon 14 (Figura 1) do gene. O aminoácido valina encontra-se localizado na interface entre os domínios JH1 e JH2 e a troca por uma fenilalanina esta associada à diminuição do controle do domínio inibitório JH2 sobre o domínio quinase JH1 acarretando a ativação constitutiva da proteína (VAINCHENKER *et al.*, 2011) (Figura 2).

Figura 2: Localização da mutação V617F no gene de proteína Janus Kinase 2 (JAK2)

A mutação também foi identificada por Levine e colaboradores (2005) em amostras de DNA de granulócitos de 74% (121 de 164) pacientes com PV e 32% (37 de 115) pacientes com TE e por Kralovics e colaboradores (2005) em 65% (83 de 128) pacientes com PV e 23% (21 de 93) pacientes com TE.

JAK2 desregulada está associada a diversas alterações em marcadores moleculares de NMPs, tais como Bcl-x, Mpl e PRV-1. Nesse contexto, JAK2 ativa STAT5, que por sua vez estimula a transcrição de Bcl-x_L, proteína anti-apoptótica que pode estar associada ao acúmulo das células da linhagem mielóide presente nos pacientes portadores V617F.

Nosso grupo de pesquisa (TOGNON *et al.*, 2011) detectou, em células CD34⁺, aumento na expressão de moléculas relacionadas a apoptose como *FAS*, *FAIM* e *C-FLIP* em PV, TE e MFP e também altos níveis de expressão de *FAS_L* em MFP e *DR4* em TE. Já em leucócitos de pacientes NMPs, *FAS*, *C-FLIP* e *TRAIL* apresentaram aumento na expressão em PV e *DR5* em TE. Além disso, células mononucleares desses pacientes apresentaram resistência à indutores de apoptose.

Um fator relevante para o fenótipo da doença é a diferença na carga mutacional de pacientes homozigotos e heterozigotos. Em pacientes homozigotos nota-se estímulo a eritropoese enquanto que em pacientes heterozigotos, as contagens dos elementos figurados do sangue periférico e medula óssea são menores. Além disso, a incidência de esplenomegalia e necessidade de terapia citorrredutiva são maiores em pacientes homozigotos (VANNUCCHI *et al.*, 2008).

Essa mutação, apesar de ser importante na patogenia dessas doenças, parece não ser a única responsável pelos achados clínico-laboratoriais dos pacientes, visto que a sua presença conduz ao desenvolvimento de doenças distintas. Pacientes com TE e MFP JAK2V617F negativos mostram evidências de hematopoese clonal, apontando para existência de outras alterações genéticas que contribuiriam para a patogênese dessas doenças (LEVINE *et al.*, 2006). Em pacientes JAK2V617F negativos foram descritas outras mutações como no éxon 12 no gene da JAK2 em pacientes com PV (SCOTT *et al.*, 2007), em receptores de citocinas hematopoéticas-específicos como receptores de eritropoetina (EPO), receptor de trombopoetina (MPL) e o receptor de fator estimulante de colônias granulocíticas (GCSF-R) na tentativa de explicar a ativação da via JAK/STAT (PIKMAN *et al.*, 2006).

A identificação de mutação na sinalização de JAK2 possibilitou o desenho de fármacos inibidores dessa enzima, alguns em fase de estudos pré-clínicos, mesmo assim a descrição de novas terapias é importante para o tratamento dessas doenças.

Nesse sentido, mesmo com o recente conhecimento adquirido acerca das NMPs, permanece a relevância da realização de estudos que visam à elucidação da patogênese dessas doenças.

Dessa forma, visando a expansão dos conhecimentos concernentes a fisiopatologia das NMPs, o presente trabalho contribuirá com a avaliação da expressão das galectinas 1 e 3 em PV, TE e MFP.

I.2. Galectinas

As galectinas (Gal) são proteínas com estrutura de β -folha formadas por aproximadamente 135 aminoácidos, filogeneticamente conservadas e que pertencem a família de lectinas. Essas proteínas apresentam uma região de reconhecimento de carboidrato (CRD)

responsável por se ligar a β -galactosídeos (BARONDES *et al.*, 1994), o que as torna portanto, como citado anteriormente, lectinas.

As folhas são ligeiramente dobradas formando um lado côncavo e um lado convexo. O lado côncavo forma um sulco no qual o carboidrato pode se ligar. Assim, esquematicamente, podemos dividir o local de ligação de carboidratos em cinco sub-regiões principais: A, B, C, D e E. Nas regiões C e D ocorrem as ligações entre os resíduos de aminoácidos principais, Asparagina e Arginina, e a β -galactose, local de definição do sítio de ligação das galectinas. Os demais sítios têm a função de estabilização das ligações ao carboidrato (LEFFLER *et al.*, 2001) (Figura 3).

Figura 3: Sítio de reconhecimento de carboidratos da galectina. Cinco sub-regiões A,B,C,D e E do CRD da galectina, com seus resíduos de aminoácidos, interagindo com um carboidrato Galβ1-4Glc. Adaptado de LEFFLER *et al.*, 2001.

Até o momento foram identificadas em mamíferos 15 tipos de galectinas, as quais foram classificadas de acordo com suas estruturas químicas em: as que contêm um CRD, as prototípicas (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15), as galectinas com estrutura em *tandem*, que contêm dois CRD diferentes em um simples sítio polipeptídico (galectinas 4, 6, 8,

9 e 12) e as quiméricas que apresentam CRD ligados às regiões N-terminais, como é o caso da Gal-3 (YANG *et al.*, 2008) (Figura 4).

Figura 4: Tipos de estrutura das galectinas e formação de redes entre galectinas e carboidratos multivalentes. a) Monômeros e dímeros de galectinas do tipo protótipo que possuem apenas um domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) do lado esquerdo, e exemplo de rede estabelecida entre galectinas (verde) e carboidratos (preto) do lado direito. b) Monômeros e pentâmeros da galectina-3, com estrutura do tipo quimera do lado esquerdo, e exemplo de rede formada entre galectina-3 (azul) e carboidratos multivalentes (vermelho). c) Monômeros de galectinas com repetições em tandem de CRDs diferentes e, portanto, com dois CRDs do lado esquerdo e um exemplo de rede formada entre esse tipo de galectina (roxo) e carboidratos (amarelo) multivalentes do lado direito. Adaptado de YANG *et al.*, 2008.

Além da diferença estrutural, outro aspecto que diferencia as galectinas é a valência de seus domínios de reconhecimento, a maioria é bivalente ou multivalente. As galectinas que possuem estrutura em *tandem*, por possuírem dois CRD, são no mínimo bivalentes. A maioria do tipo protótipo, que possuem um CRD, são bivalentes e a Galectina-3 (Gal-3) fica na forma pentamérica quando ligada a carboidratos multivalentes (AHMAD *et al.*, 2004). Esta

característica das galectinas lhes permite formar redes mixtas entre estas proteínas e carboidratos multivalentes (SACCHETTINI *et al.*, 2001; BREWER *et al.*, 2002).

As galectinas são sintetizadas nos ribossomos e desempenham funções intracelulares que diferem quando presentes no citosol ou no núcleo (LIU, 2004; NORLING *et al.*, 2009). Apesar dessas lectinas não possuírem seqüência sinalizadora clássica que permite sua secreção, podem ser secretadas por meio de vesículas para a superfície celular, passando a exercer outras funções extracelulares, autócrinas ou parácrinas e que dependem, por sua vez, das proteínas de superfície presentes na célula e contexto celular (ELOLA *et al.*, 2007).

Essas lectinas participam do processo de regulação da transdução de sinal celular interagindo com ligantes e participando das vias de sinalização intracelulares (LIU *et al.*, 2002). A conservação dessas proteínas durante a evolução sugere que estas moléculas têm papel essencial em funções vitais de organismos multicelulares, incluindo: adesão, migração, diferenciação, proliferação e apoptose celular (LEFFLER *et al.*, 2001; GOLDRING *et al.*, 2002).

Nesse estudo foi avaliada a possível associação da expressão dos genes *LGALS1* e *LGALS3* com genes envolvidos na regulação do processo de apoptose e fisiopatologia das NMPs.

Rabinovich e colaboradores (2005) mostraram que Gal-1 induz apoptose em células T ativadas e em timócitos imaturos contribuindo para a manutenção da tolerância imunológica. Os eventos que levam a indução da apoptose por Gal-1 incluem a expressão de fatores de transcrição específicos como *AP-1*, modulação negativa da expressão de *BCL-2*, ativação de caspases e regulação da liberação de citocromo c.

Outro trabalho sugere que Gal-1 está envolvida no processo de “turnover” de leucócitos, ativando-os para que sejam, posteriormente, fagocitados. Foi mostrado que Gal-1 induz exposição de fosfatidilserina em células HL-60 independentemente de alterações no

potencial de membrana, ativação de caspases ou morte celular. Isso sugere uma possível via de regulação da morte e sobrevivência dos leucócitos independente da apoptose (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2009).

HARJACEK e colaboradores (2001) mostraram que *LGALS1* apresentava-se *hipoexpressa* e *LGALS3 hiperexpressa* em células do tecido sinovial de pacientes com Artrite Idiopática Juvenil e, além disso, moléculas relacionadas a apoptose como, por exemplo, *BCL-2*, também apresentaram expressão alterada. Os autores sugeriram que a apoptose deficiente já descrita nestes pacientes pode ser explicada, em partes, pela desregulação nos níveis de expressão de *LGALS1* e *LGALS3*.

Galectina-3 (Gal-3) tem a capacidade de agir de maneiras distintas dependendo da sua localização, intra ou extracelular, atuando como proteína anti ou pró-apoptótica, respectivamente. Por exemplo, o tratamento de células T com Gal-3 recombinante extracelular induz a apoptose dessas células via ativação de caspases (FUKUMORI *et al.*, 2003). Galectina-3 apresenta seqüência de aminoácidos similar a Bcl-2, uma proteína anti apoptótica, e sugere-se que Gal-3 interaja com Bcl-2 para a inibição da morte celular. Além disso, foi mostrado que *LGALS3* está superexpressa em células no estágio exponencial de proliferação, sugerindo um possível papel regulador dessa proteína na proliferação celular (YANG *et al.*, 1996). Li e colaboradores (2008) mostraram que camundongos *knockout* de *LGALS3* apresentaram aumento na produção de citocinas inflamatórias em resposta a lipopolissacarídeo (LPS), o que sugere a participação de Gal-3 extracelular no processo de regulação/inibição de respostas inflamatórias.

Gal-3 é ainda descrita como potencial molécula de adesão capaz de promover, *in vitro*, a interação dos neutrófilos às células do endotélio vascular. Esses resultados sugerem a contribuição de gal-3 no recrutamento dos neutrófilos dos capilares sanguíneos para os sítios de infecção (SATO *et al.*, 2002).

Em conclusão, ambas lectinas parecem participar e contribuir não só para o melhor funcionamento dos processos fisiológicos dos indivíduos, mas também no estabelecimento e progressão de numerosas doenças (VAN DEN BRÛLE, *et al.*; 2004). Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa dicotomia de função são alvos de estudos por vários grupos de pesquisa.

I.3. Galectinas e neoplasias

Há na literatura numerosos trabalhos que descrevem a potencial relação de neoplasias e expressão de galectinas, principalmente com a Gal-1. A expressão desregulada da *LGALS1* está associada à alteração nos processos de adesão celular (LOTAN, *et al.*; 1994); escape do tumor à resposta imune (PERILLO, *et al.*; 1995), proliferação celular exacerbada e alteração do controle da apoptose celular (LUTOMSKI, *et al.*; 1997; PACIENZA, *et al.*; 2008).

Foi observado que em células tumorais de Leydig as altas concentrações de Gal-1 são as responsáveis diretas pela inibição da proliferação celular enquanto que baixas concentrações induzem a mitose das células (BIRON, *et al.*; 2006). Nessa mesma linha de pensamento células de linhagem de câncer de próstata transfectadas com o vetor contendo o gene *LGALS1*, apresentaram diminuição da proliferação e aumento da taxa de apoptose (ELLERHORST *et al.*; 1999).

BRANDT e colaboradores (2008) mostraram que Gal-1 pode ter como alvo a proteína pro-apoptótica Fas, estimulando a ativação e o processo de proteólise da procaspase-8 e procaspase-3 em células derivadas de linfoma de células T (Jurkat-T).

Galectina-3 parece estar ligada a processos de tumorigênese, visto que quando presente no citoplasma atua como molécula anti-apoptótica e há relatos de *superexpressão* em neoplasias da tireóide, cólon e fígado (TAKENAKA, *et al.*; 2003). O trabalho de Honjo e co-autores (2001) reforça essa hipótese, pois descreve que a inibição da expressão de *LGALS3*

impede a transformação da célula mamária em carcinoma mamário. Uma possível explicação sobre o mecanismo de transformação mediado pela Gal-3 seria sua interação com proteínas da família RAS, principalmente o proto-oncogene K-RAS, promovendo a ativação de RAF1 e PI3-K e, conseqüentemente, a ativação das vias de sinalização e fatores de transcrição gênica (ELAD-SFADIA *et al.*; 2004).

Além disso, Gal-3 tem sido a candidata a potencial marcador molecular de diagnóstico de câncer de tireóide, pois se apresenta altamente expressa nesse tumor quando comparado ao tecido normal ou ao tecido com lesões benignas (CAY, *et al.*; 2012).

Matarrese e colaboradores (2000) estudaram a atuação de Gal-3 como uma molécula anti-apoptótica, função bastante descrita na literatura. Nesse trabalho os autores mostraram, em células de linhagem celular de câncer de mama transfectadas com *LGALS3*, que a superexpressão dessa lectina coibiu a alteração do potencial de membrana mitocondrial e a formação de espécies reativas de oxigênio. Os autores propõem a participação da Gal-3 na homeostase mitocondrial e conseqüentemente da sobrevivência e morte celular.

Cheng e colaboradores (2011) investigaram os mecanismos pelos quais Gal-3 atua como molécula anti-apoptótica. Nesse trabalho, as células BCR-ABL⁺ K562 transfectadas com *LGALS3* foram resistentes à apoptose, enquanto que o silenciamento de *LGALS3* promoveu susceptibilidade das células à apoptose. Os autores mostraram ainda que quando as células K562 são tratadas com cisplatina há translocação de Gal-3 para a mitocôndria, inibição da degradação de Mcl-1 e Bcl-x_L, moléculas anti-apoptóticas que seriam degradadas pelo tratamento com cisplatina e aumento na expressão de *BCL-2*, gene anti-apoptótico.

Em outro trabalho também foi mostrado esse mecanismo de atuação de galectina-3. Neste estudo, diante de estímulos apoptóticos, galectina-3 translocou-se para as membranas perinucleares, dentre elas, a membrana mitocondrial, resultando altas concentrações dessa lectina na mitocôndria. Além disso, o estudo também mostrou que a translocação de gal-3

inibiu a liberação de citocromo c, evitou dano mitocondrial e ativação das cascata de caspases (YU, *et al.*; 2002).

A relação da expressão de galectinas *LGALS1* e *LGALS3* e LMC foi foco de estudo em tese de doutorado de nossos colaboradores do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (YON, 2009). Nesse estudo, células BCR-ABL⁺ apresentaram maior expressão de *LGALS1*, mas não de *LGALS3* quando comparadas as células que não expressavam essa oncoproteína. As células de pacientes com LMC apresentaram expressão elevada de *LGALS1*, esse aumento correlacionou-se com os níveis de expressão de BCR-ABL, progressão da doença e a menor sobrevida dos pacientes com LMC. Os dados dessa tese sugeriram ainda a participação de Gal-1 no processo de tumorigênese induzido por Bcr-Abl quando o modelo animal murino foi analisado (YON, 2009-tese de doutorado).

Recentemente, Asgarian-Omran e colaboradores (2010) investigaram a expressão de *LGALS1* e *LGALS3* em células de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e mostraram que a expressão de *LGALS3* está diminuída nos pacientes em relação aos controles, entretanto *LGALS1* manteve sua expressão. Essa investigação apontou ainda para a contribuição Gal-3 na fisiopatologia da LLC e na progressão da doença, visto que altos níveis dessa molécula foram observados nos pacientes cujo curso da doença foi mais agressivo.

A partir das observações supracitadas especulamos que Galectina-1 e 3 podem participar da fisiopatologia das NMPs visto que essas lectinas parecem interferir na proliferação, apoptose celular e na via JAK/STAT e que as NMPs caracterizam-se pela presença de mieloproliferação e alteração na expressão de moléculas envolvidas no processo de apoptose celular.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1. Quantificar a expressão de galectinas 1 e 3 em pacientes com PV, TE e MFP e em indivíduos saudáveis;

II.2. Determinar a concentração plasmática de galectina-3 em pacientes com PV, TE e MFP e em indivíduos saudáveis;

II.3. Analisar se a expressão das galectinas-1 e 3 está associada ao *status* da mutação JAK2 em pacientes com PV, TE e MFP;

II.4. Correlacionar os níveis *LGALS1* e *LGALS3* com a expressão dos genes que regulam à apoptose em pacientes com PV, TE e MFP (dados obtidos durante o desenvolvimento dos projetos jovem pesquisador da orientadora da aluna e dos demais alunos do laboratório da orientadora vinculados ao processo FAPESP JP 06/50094-6) ;

II.5. Correlacionar os resultados de expressão gênica de *LGALS1* e *LGALS3* obtidos com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes, tais como percentagem de alelos mutados JAK2, concentração de hemoglobina, percentagem de hematócrito e contagem de leucócitos e tamanho do baço;

II.6. Correlacionar os dados da concentração de galectina-3 plasmática com os resultados clínico-laboratoriais dos pacientes, tais como percentagem de alelos mutados JAK2, concentração de hemoglobina, percentagem de hematócrito e contagem de leucócitos e tamanho do baço.

III. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

III. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Casuística

Foram avaliados no projeto 27 pacientes com Policitemia Vera, com idade média de 61,96 anos, faixa etária entre 39 e 79 anos, nove do sexo masculino e dezessete do sexo feminino, sendo quatro negros, três asiáticos e vinte caucasóides; 39 pacientes com Trombocitemia Essencial, com média de idade de 58,23 anos, faixa etária entre 20 e 81 anos, dez do sexo masculino e vinte e nove do sexo feminino, sendo quatro negros e trinta e cinco caucasóides e 14 pacientes com Mielofibrose Primária, com média de idade de 63,64 anos, com faixa etária entre 41 e 80 anos, doze do sexo masculino e dois do sexo feminino, sendo todos brancos. Os pacientes foram provenientes do Hospital Brigadeiro de São Paulo (atual Hospital de Transplantes Euryclides Zerbini de São Paulo) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

O diagnóstico foi realizado conforme os critérios de diagnóstico da OMS descritos abaixo e as características demográficas dos pacientes estão apresentadas nas tabelas 1, 2 e 3.

O grupo controle foi composto por 44 indivíduos saudáveis, doadores voluntários de sangue periférico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sendo 16 do sexo masculino e 28 do sexo feminino, três negros e 43 caucasóides, com idade média de 58,63 anos (faixa etária: 20-80 anos) e 16 doadores de medula óssea do HCFMRP-USP, dez do sexo masculino e seis do sexo feminino, 14 caucasóides e dois negros, com média de idade de 29,75 anos (faixa etária: 16-54 anos). As características demográficas dos controles estão descritas nas tabelas 4 e 5.

A seleção e o acompanhamento clínico foram realizados pelas hematologistas Profa. Dra. Belinda Pinto Simões do HCFMRP-USP e Dra. Elizabeth Xisto Souto Hospital Brigadeiro. O presente projeto de pesquisa foi aprovado em 21 de julho de 2010 pelo Comitê

de Ética em Pesquisa de Seres Humanos, com Ofício nº 3789/2010, processo HCRP número 10374/2010.

III.2. Critérios de diagnóstico das NMPs, segundo a OMS

a) Critérios de diagnóstico de PV:

Critérios maiores: Hemoglobina >18,5g/dL para homens, >16,5g/dL para mulheres ou outras evidências de aumento de massa eritrocitária; presença da mutação JAK2V617F no éxon 14 ou outra funcionalmente similar (Ex: éxon 12);

Critérios menores: Biópsia Medula Óssea demonstrando hiper celularidade para a idade com panmielose (proliferação proeminente das séries eritróide, granulocítica e megacariocítica); eritropoetina sérica abaixo do valor de normalidade; formação *in vitro* de colônia eritróide endógena.

Para confirmação da hipótese diagnóstica o paciente deve apresentar os dois critérios maiores e um critério menor ou o primeiro critério maior acompanhado de dois critérios menores.

b) Critérios de diagnóstico de TE:

Plaquetometria >450.000/ μ L sustentada; BMO mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariocítica com megacariócitos maduros aumentados em número e tamanho; ausência de aumento significativo ou desvio à esquerda granulopoes neutrofílica ou eritropoes; ausência de critérios da OMS para PV, MF, LMC BCR/ABL⁺, síndrome mielodisplásica [ausência de del(5q), t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21;q26)] ou outra neoplasia mielóide; presença da mutação JAKV617F ou outras.

Para confirmação da hipótese diagnóstica de PV o paciente deve apresentar os quatro critérios diagnósticos da classificação da OMS.

c) Critérios de diagnóstico de MFP:

Critérios maiores: presença de proliferação megacariocítica e atipia, geralmente acompanhada de fibrose reticulínica ou colagênica ou, na ausência de fibrose significativa, as alterações megacariocíticas devem se acompanhar de aumentada celularidade da medula à custa de proliferação granulocítica com diminuição da eritropoese (fase préfibrótica); ausência de critérios da OMS para PV, LMC BCR/ABL⁺, síndrome mielodisplásica ou outra neoplasia; presença da mutação JAK2V617F ou outro marcador clonal (MPLW515K/L) ou, na ausência de marcador clonal, nenhuma evidência de que a fibrose medular ou demais alterações sejam secundárias a infecção, inflamação, tricocitoleucemia, neoplasia linfóide, metástase ou mielopatias tóxicas.

Critérios menores: leucoeritroblastose; aumento de DHL sérico; anemia; esplenomegalia. Para confirmação da hipótese diagnóstica de MFP o paciente deve apresentar pelo menos três critérios maiores e dois menores.

Tabela 1- Características demográficas dos pacientes com Policitemia Vera.

PACIENTE	IDADE	GÊNERO	RAÇA
PV 01	50	F	N
PV02	66	F	B
PV03	80	F	B
PV04	54	F	N
PV05	58	M	B
PV06	59	M	B
PV07	54	F	B
PV08	60	F	N
PV09	68	F	B
PV10	83	F	B
PV11	52	M	B
PV12	73	F	N
PV13	54	F	B
PV14	76	F	A
PV15	39	F	B
PV16	75	M	B
PV17	57	M	B
PV18	57	M	B
PV19	51	F	B
PV20	79	M	B
PV21	61	M	A
PV22	47	M	B
PV23	56	M	B
PV24	65	F	B
PV25	69	F	B
PV26	69	F	A
PV27	61	F	B

PV (Policitemia Vera), F (gênero Feminino), M (gênero Masculino), B (Branco) e N (Negro).

Tabela2- Características demográficas dos pacientes com Trombocitemia Essencial.

PACIENTE	IDADE	GÊNERO	RAÇA
TE01	41	F	B
TE02	66	M	B
TE03	40	F	B
TE04	58	F	B
TE05	60	M	B
TE06	68	F	B
TE07	54	M	B
TE08	66	F	B
TE09	59	F	B
TE10	62	F	B
TE11	58	F	N
TE12	73	F	N
TE13	50	F	B
TE14	67	M	B
TE15	51	F	B
TE16	75	F	B
TE17	79	F	N
TE18	80	F	B
TE19	70	F	B
TE20	62	F	B
TE21	35	F	B
TE22	71	F	B
TE23	53	F	B
TE24	64	M	B
TE25	50	F	B
TE26	77	F	B
TE27	74	M	B
TE28	31	F	B
TE29	61	F	B
TE30	55	F	B
TE31	20	F	B
TE32	54	M	B
TE33	46	M	B
TE34	36	F	B
TE35	44	M	B
TE36	81	M	B
TE37	59	F	N
TE38	65	F	B
TE39	56	F	B

TE (Trombocitemia Essencial), F (gênero Feminino), M (gênero Masculino), B (Branco) e N (Negro).

Tabela 3- Características demográficas dos pacientes com Mielofibrose Primária.

PACIENTE	IDADE	GÊNERO	RAÇA
MFP01	71	F	B
MFP02	41	M	B
MFP03	64	M	B
MFP04	52	M	B
MFP05	68	M	B
MFP06	55	M	B
MFP07	61	M	B
MFP08	59	F	B
MFP09	58	M	B
MFP10	62	M	B
MFP11	69	M	B
MFP12	80	M	B
MFP13	73	M	B
MFP14	78	M	B

MFP (Mielofibrose Primária), F (gênero Feminino), M (gênero Masculino), B (Branco) e N (Negro).

Tabela 4- Características demográficas dos controles de medula óssea (MOC).

CONTROLE	IDADE	GÊNERO	RAÇA
MOC1	29	M	N
MOC2	16	F	B
MOC3	30	M	B
MOC4	36	M	B
MOC5	54	M	B
MOC6	40	M	B
MOC7	21	F	B
MOC8	30	M	N
MOC9	32	F	B
MOC10	20	F	B
MOC11	30	M	B
MOC12	28	M	B
MOC13	48	M	B
MOC14	21	F	B
MOC15	16	M	B
MOC16	25	F	B

MOC (medula óssea controles), F (gênero Feminino), M (gênero Masculino), B (Branco) e N (Negro).

Tabela 5- Características demográficas dos controles de sangue periférico (SPC).

CONTROLE	IDADE	GÊNERO	RAÇA
SPC1	80	F	B
SPC2	41	F	B
SPC3	41	F	B
SPC4	44	M	B
SPC5	59	M	B
SPC6	60	F	B
SPC7	50	F	B
SPC8	55	F	N
SPC9	50	M	B
SPC10	68	F	B
SPC11	60	M	B
SPC12	49	F	B
SPC13	52	M	B
SPC14	50	M	B
SPC15	83	F	B
SPC16	66	F	B
SPC17	58	M	B
SPC18	54	F	N
SPC19	72	M	B
SPC20	38	F	B
SPC21	60	F	N
SPC22	61	F	B
SPC23	65	M	B
SPC24	60	F	B
SPC25	52	M	B
SPC26	61	F	B
SPC27	76	F	B
SPC28	69	F	B
SPC29	77	F	B
SPC30	54	F	B
SPC31	76	F	B
SPC32	78	F	B
SPC33	71	M	B
SPC34	71	F	B
SPC35	58	M	B
SPC36	70	M	B
SPC37	54	F	B
SPC38	48	F	B
SPC39	45	M	B
Continua....			

CONTROLE	IDADE	GÊNERO	RAÇA
SPC40	57	M	B
SPC41	54	F	B
SPC42	33	F	B
SPC43	80	M	B
SPC44	20	F	B

SPC (sangue periférico controle); F (gênero Feminino), M (gênero Masculino), B (Branco), N (Negro).

III.3. Material e Métodos

III.3.1. Obtenção dos leucócitos e células CD34⁺ hematopoéticas

Foram colhidos 40 mL de sangue periférico (SP) dos pacientes, 20 mL de sangue periférico dos controles e 10 mL de medula óssea dos pacientes e indivíduos saudáveis. Os leucócitos totais do SP serão separados pelo método de Haes-esteril (Voluven[®], Frasenius Kabi, Campinas, Brasil). Na técnica de Haes-esteril, o sangue total é misturado com 20% de Haes-esteril, homogeneizado e permanece decantando por 120 minutos. O sobrenadante contendo os leucócitos foi separado e centrifugado a 1810 x g por 15 minutos. As hemácias do pellet foram lisadas com adição de 2 mL de tampão de lise de hemácias ACK (3 g/L de cloreto de amônio, 1 g/L de bicarbonato de potássio e 0,036 g/L de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) e após lavagem com tampão salina fosfato (PBS), a concentração dos leucócitos foi ajustada em alíquotas que variaram de 5×10^6 a 1×10^7 para congelamento em Trizol[®] (Invitrogen[®], Life Technologies Carlsbad, EUA) a -80°C. Para isolamento das células tronco hematopoéticas, as células mononucleares da medula óssea foram separadas pelo método do Ficoll-Hypaque, foram lavadas em tampão PBS-ACD acrescido de albumina 0,05% (InLab, São Paulo, SP, Brasil) e ressuspensas no mesmo tampão. Em seguida, a suspensão celular foi submetida à separação das células CD34 positivas por coluna imunomagnética, utilizando-se anticorpo monoclonal conjugado a *beads* conforme protocolo do fabricante (MACS[®], Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemanha).

III.3.2. Determinação do Hemograma dos Pacientes

Os hemogramas dos pacientes foram realizados em colaboração com o Laboratório Clínico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. O analisador hematológico utilizado para a determinação dos parâmetros hematológicos do paciente na data da colheita do sangue periférico foi o Cell Dyn 3500SL.

Valores de referência: Contagem de leucócitos 3,9-11 k/ul; contagem de eritócitos 3,5-5,2 M/ul; concentração de hemoglobina 11-16g/dl; porcentagem de hematócrito 36-46%; contagem de plaquetas 125-450 k/ul.

III.3.3. Detecção da mutação JAK2 V617F no sangue periférico

A detecção da mutação V617F do gene da JAK2 e a determinação da porcentagem de alelos mutados foram feitas pelo laboratório de referência *Fleury Medicina e Saúde*, de São Paulo pela técnica de discriminação alélica utilizando PCR em tempo real.

O ensaio utilizou duas sondas fluorogênicas (MGB) para detecção da mutação G → T no éxon 14 do gene JAK2. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (forward: 5'GCAGCAAGTATGATGAGCAAGCT3';reverse:5'GGCATTAGAAAGCCTGTAGTTTACTTAC -3') e das sondas MGB foram desenhadas utilizando-se o software Primer Express, versão 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sondas de hibridização foram desenhadas com dois fluorocromos diferentes para permitir a discriminação alélica em um único tubo. Uma delas continha FAM (6-carboxifluorescein) e tinha como alvo o alelo selvagem (5'-6-FAM-TGGAGTATGTGTCTGTGGA-3') e a outra para o alelo mutante tinha como fluorocromo o reporter VIC (6-carboxyrhodamine 6G) (5' -VIC-TGGAGTATGTTTCTGTGGAG -3'). Os oligonucleotídeos foram sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) e as sondas foram sintetizadas pela Applied Biosystems. A amplificação por PCR em tempo real foi feita utilizando-se o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em uma reação com volume final de 12.5 µL contendo 0.3 µM de cada primer, 0.2 µM de cada sonda e DNA. O ciclo utilizado foi: 50°C por 2 minutos para ativação da Uracil-N-Glicosilase (UNG), 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no equipamento Rotor-Gene 3000 (Corbett Research).

Cada ensaio de PCR incluiu um controle negativo. A porcentagem de alelos mutados foi estimada baseando-se no sinal fluorescente normalizado do alelo mutante (R_n mutante) e do alelo selvagem (R_n selvagem) localizado na região da amplificação exponencial (próximo ao ciclo de número 30 para a maioria das amostras) da PCR em tempo real e apresentados com porcentagem de mutação JAK2V617F ou negativo, como mostrado na equação abaixo:

$$\% \text{ mutação JAK2V617F} = R_n \text{ mutante} / (R_n \text{ mutante} + R_n \text{ selvagem})$$

III.3.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

Os leucócitos e as células progenitoras dos pacientes foram lisados pelo trizol e o RNA-mensageiro obtido e purificado com o uso de uma mistura de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol, Invitrogen[®], Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), conforme protocolo do fabricante. O RNA foi recuperado da fase aquosa pela adição de clorofórmio e centrifugação, seguida de precipitação com isopropanol e nova centrifugação. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 13µL de água livre de RNases e DNases. A concentração de RNA total foi quantificada em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm.

O RNA extraído das células foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para determinação de sua qualidade e integridade (Figura 5). A eletroforese em gel de agarose foi realizada a corrente elétrica de 80 Volts durante 50 minutos e as bandas 28S, 18S e 5S de RNA foram visualizadas em transiluminador UV devido à incorporação de brometo de etídio (0,5µg/mL). Após a constatação da integridade e qualidade do RNA, sem contaminações por DNA ou degradação, o mesmo foi empregado na síntese de cDNA por transcrição reversa.

Figura 5. Exemplo de gel de agarose 1% com RNA extraídos de sete amostras de sangue periférico de pacientes e controles. Observa-se a visualização das bandas 28S, 18S e 5S do RNA.

Para obtenção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo utilizado 1µg de RNA por reação e o seguinte ciclo: 25°C por 10 minutos e a 37°C por duas horas no equipamento Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Os cDNA dos pacientes e controles foram utilizados nos ensaios de PCR em tempo real. Para tanto, oligonucleotídeos (primers) específicos foram desenhados para a amplificação dos *LGALS1* e 3 (tabela 6) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os programas utilizados no processo de amplificação das amostras foram padronizados durante o desenvolvimento do projeto. Foram empregados como controle da qualidade da amplificação e síntese de cDNA os genes *housekeeping* (genes endógenos) *β-actina* e *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* (GAPDH). Os cDNA dos pacientes foram amplificados e quantificados por PCR em tempo real utilizando-se o Kit SybrGreen Quantitect (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA) e o aparelho ABIPrism 7700 (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos pelo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que é calculado considerando-se a razão entre o gene testado e o gene endógeno (*GAPDH* e/ou *B-ACTINA*) em relação às amostras controles (calibradores).

Tabela 6: Sequências dos oligonucleotídeos empregados na quantificação da expressão de *LGALS1*, *LGALS3*, genes endógenos e reguladores da apoptose celular.

Oligonucleotídeo	Sequências (5'→3')	Produto (pb)	TA (°C)
<i>LGALS1</i>	F: GAG TGC GAG GCG AAG TGG CT R: CCC CGC CGT CCT TGC TGT T	153	61
<i>LGALS3</i>	F: CTG GCG CAT GGG GGA ACC A R: CCG GGG GCA CTT GGC TGT C	241	60
<i>GAPDH</i>	F: GGA GAA GGC TGG GGC TCA T R: GTC CTT CCA CGA TAC CAA AGT T	206	60
<i>ACTINA</i>	F: GTG GGC ATG GGT CAG AAG R: GGC CAT CTC TTG CTC GAA	192	58
<i>BAX</i>	F: CCC TTT TGC TTC AGG GTT TC R: TCT TCC AGA TGG TGA GTG	501	56
<i>BID</i>	F: GCT TCC AGT GTA GAC GGA GC R: GTG CAG ATT CAT GTG TGG ATG	169	60
<i>BIK</i>	F: TCT GCA ATT GTC ACC GGT TA R: TTG AGC ACA CCT GCT CCT C	203	62
<i>BCL-2</i>	F: ACG AGT GGG ATG CGG GAG ATG TG R: GCG GTA GCG GCG GGA GAA GTC	245	67
<i>BCL-X_L</i>	F: CTG AAT CGG AGA TGG AGA CC R: TGG GAT GTC AGG TCA CTG AA	211	60
<i>A1</i>	F: GGC TGG CTC AGG ACT ATC R: CCA GTT AAT GAT GCC GTC	227	50
<i>MCL-1</i>	F: AGA AAG CTG CAT CGA ACC AT R: CC AGC TCC TAC TCC AGC AAC	183	56
<i>FAS</i>	F: CAA GGG ATT GGA ATT GAG GA R: TGG AAG AAA AAT GGG CTT TG	203	55
<i>C-FLIP</i>	F: GCC GAG GCA AGA TAA GCA R: GCC CAG GGA AGT GAA GGT	176	55
<i>C-IAP-2</i>	F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT R: TGC TTT TGC CAG ATC TGT TG	464	54
<i>FASL</i>	F: AGG AAA GTG GCC CAT TTA AC R: CAA GAT TGA CCC CGG AAG TA	176	55
<i>C-IAP-1</i>	F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT R: ATG GAC AGT TGG GAA AAT GC	550	59

F: forward; R: reverse, TA: temperatura de anelamento, pb: pares de base.

III.3.5 Detecção das galectinas 1 e 3 por *western blot*

Os leucócitos dos pacientes, na concentração de 2×10^6 , foram ressuspensos em 200 μ l (diluição 1:1) de tampão SDS 2x (5% de mercaptoetanol, 4% de SDS, 20% de glicerol e 100mM Tris-CL-pH 6.8) e fervidos a 100°C por 5 minutos. Essas amostras protéicas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF (Brumatti *et al*, 2003). As membranas de *western-blot* foram bloqueadas em tampão de lavagem com 5% de leite desnatado por 12 horas à temperatura ambiente (TA) e subsequentemente incubadas com anticorpos para detecção das galectinas diluídos em diferentes concentrações (conforme protocolo do fabricante) em tampão de lavagem por um período de 18h a 4°C. Após três lavagens de 10 minutos, os *blots* foram incubados com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por uma hora a TA. A detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência e a intensidade das bandas reconhecidas foi quantificada por densitometria pelo programa "*DigDoc, Alphaease 3.2*" (Brumatti *et al*, 2003). Os resultados foram expressos em razão da intensidade da densidade da banda das proteínas marcadas pelos anticorpos (Intensity Density Value, IDV) da proteína investigada pela IDV da proteína actina (proteína de referência).

III.3.6. Detecção da galectina-3 plasmática por ELISA

A quantificação de galectina-3 no plasma dos pacientes foi realizada empregando-se o Kit *Quantikine* de dosagem para galectina-3 humana (R&D Systems) conforme protocolo do fabricante.

Para dosagem de galectina-1 no plasma dos pacientes não foi encontrado Kit comercial adequado. Além disso, tentamos padronizar a reação de ELISA utilizando anticorpos de nossos colaboradores, entretanto, devido a reações cruzadas com os anticorpos, não obtivemos sucesso nessa padronização.

III.3.7. Análise Estatística

A comparação dos dados de expressão das *LGALS1* e *LGALS3* e da galectina-3 plasmática entre os pacientes com NMP e controles foi realizada com o teste estatístico de Mann-Whitney. As correlações entre os dados clínico-laboratoriais e os da expressão de *LGALS1* e *LGALS3* e da concentração da galectina-3 plasmática e com a expressão dos genes envolvidos na regulação da apoptose foram determinadas pelo teste de Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor do p foi menor do que 0,05.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. Determinação da pureza das células CD34⁺ por citometria de fluxo

A pureza das células CD34⁺ obtidas da medula óssea de pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária foi em média de 87,41; 85,81 e 88,88, respectivamente. (mediana PV: 91,73; faixa: 62,64% a 99,5%; mediana TE: 90,43; faixa: 49,5% a 98,29%; mediana MFP: 92,65; faixa: 66% a 98,46%). Para as amostras PV01, PV18, PV24, TE08, TE19, TE32, TE35 MFP04, MFP11, MFP12 não foi possível obter os valores de porcentagem pureza das células CD34⁺ pois obtivemos volume insuficiente de medula óssea desses pacientes, o que inviabilizou a realização da citometria de fluxo para determinação da pureza das células CD34⁺ obtidas.

A pureza e o número de células CD34⁺ dos pacientes com PV, TE e MFP e dos indivíduos que constituem o grupo controle de medula óssea estão listados nas tabelas 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

IV.2. Detecção da mutação JAK2V617F e cálculo da porcentagem de alelos mutados em leucócitos de sangue periférico

Foram analisadas 27 amostras de pacientes com Policitemia Vera, 39 amostras de pacientes com Trombocitemia Essencial e 14 amostras e pacientes com Mielofibrose Primária. Das amostras analisadas, 22 de PV foram positivas para a mutação com diferentes porcentagens de alelos mutados (Tabela 11). Das amostras de TE 19 foram positivas para a (Tabela 12) e das amostras de MFP sete foram positivas para a mutação (Tabela 13). A porcentagem de alelos mutados foi diferente para cada paciente e a do paciente PV17 não pôde ser calculada por inadequação da amostra.

Tabela 7. Número de células CD34⁺ coletadas de pacientes com Policitemia Vera e porcentagem de pureza.

AMOSTRAS	Nº CÉLULAS CD34 ⁺	PUREZA(%)
PV 01	3,25x10 ⁵	ND
PV02	7,5x10 ⁵	91,69
PV03	2,0x10 ⁶	87,24
PV04	4,0x10 ⁵	91,77
PV05	1,0x10 ⁶	62,64
PV06	4,8x10 ⁵	94,86
PV07	1,62x10 ⁶	96,37
PV08	5,2x10 ⁵	90,55
PV09	4,4x10 ⁵	91,84
PV10	6,8x10 ⁵	76,57
PV11	3,37x10 ⁵	93,13
PV12	4,8x10 ⁵	97,10
PV13	3,75x10 ⁵	71,7
PV14	1,0x10 ⁶	96,00
PV15	1,84x10 ⁷	76,00
PV16	2,2x10 ⁵	84,00
PV17	5,25x10 ⁶	99,50
PV18	5,4x10 ⁴	ND
PV19	3,2x10 ⁵	98,00
PV20	1,4x10 ⁵	73,00
PV21	3,0x10 ⁵	98,00
PV22	1,52x10 ⁶	96,00
PV23	7,5x10 ⁵	98,00
PV24	1,0x10 ⁵	ND
PV25	1,5x10 ⁵	75,00
PV26	1,0x10 ⁶	68,00
PV27	1,5x10 ⁵	91,00

PV: Policitemia Vera; ND: não determinado.

Tabela 8. Número de células CD34⁺ coletadas de pacientes com Trombocitemia Essencial e porcentagem de pureza.

AMOSTRAS	Nº CÉLULAS CD34 ⁺	PUREZA(%)
TE01	1,5x10 ⁵	52,08
TE02	7,0x10 ⁵	98,29
TE03	2,0x10 ⁵	94,73
TE04	6,75x10 ⁵	90,20
TE05	2,25x10 ⁵	92,59
TE06	2,0x10 ⁵	98,70
TE07	4,0x10 ⁴	83,62
TE08	2,5x10 ⁴	ND
TE09	6,0x10 ⁵	91,94
TE10	2,25x10 ⁵	96,80
TE11	3,5x10 ⁵	92,34
TE12	1,75x10 ⁵	92,27
TE13	5,0x10 ⁴	ND
TE14	8,0x10 ⁵	58,30
TE15	9,6x10 ⁵	49,50
TE16	3,0x10 ⁵	93,92
TE17	2,6x10 ⁵	78,81
TE18	4,0x10 ⁵	80,69
TE19	2,75x10 ⁵	ND
TE20	1,0x10 ⁶	90,13
TE21	2,55x10 ⁶	88,67
TE22	2,98x10 ⁶	83,6
TE23	8,0x10 ⁵	90,66
TE24	2,5x10 ⁵	85,00
TE25	1,6x10 ⁵	92,00
TE26	3,2x10 ⁵	89,00
TE27	1,57x10 ⁷	89,00
TE28	5x10 ⁵	98,00
TE29	9x10 ⁵	92,00
TE30	1,8x10 ⁵	93,70
TE31	4x10 ⁵	55,00
TE32	5x10 ⁴	ND
TE33	6x10 ⁴	74,00
TE34	4,45x10 ⁵	94,00
Continua...		

AMOSTRAS	Nº CÉLULAS CD34 ⁺	PUREZA(%)
TE35	1,5x10 ⁵	ND
TE36	5,4x10 ⁵	83,00
TE37	2,4x10 ⁶	92,00
TE38	8x10 ⁶	85,00
TE39	1x10 ⁶	98,00

TE: Trombocitemia Essencial; ND: não determinado.

Tabela 9. Número de células CD34⁺ coletadas de pacientes com Mielofibrose Primária e porcentagem de pureza.

AMOSTRAS	Nº CÉLULAS CD34 ⁺	PUREZA(%)
MFP01	5,0x10 ⁵	92,7
MFP02	1,2x10 ⁶	66,00
MFP03	2,5x10 ⁵	96,00
MFP04	1,0x10 ⁵	ND
MFP05	1,6x10 ⁵	85,40
MFP06	6,5x10 ⁵	96,62
MFP07	4,45x10 ⁶	98,46
MFP08	2,64x10 ⁵	93,53
MFP09	2,58x10 ⁵	78,40
MFP10	2,7x10 ⁵	89,15
MFP11	2,0x10 ⁵	ND
MFP12	1,9x10 ⁵	ND
MFP13	3,5x10 ⁵	92,60
MFP14	4,25x10 ⁶	ND

MFP: Mielofibrose Primária; ND: não determinado.

Tabela 10. Número de células CD34⁺ coletadas do grupo controle e porcentagem de pureza.

AMOSTRA	Nº CÉLULAS CD34 ⁺	PUREZA (%)
MOC1	1,3 x10 ⁵	80,70
MOC2	2,0 x10 ⁶	80,22
MOC3	7,5 x10 ⁵	97,46
MOC4	2,0 x10 ⁶	95,76
MOC5	6,0 x10 ⁵	87,43
MOC6	5,0 x10 ⁴	88,19
MOC7	5,5 x10 ⁵	87,30
MOC8	1,9 x10 ⁶	92,00
MOC9	2,0 x10 ⁶	90,30
MOC10	8,0 x10 ⁵	92,7
MOC11	3,15 x10 ⁶	ND
MOC12	4,5 x10 ⁶	83,00
MOC13	9x10 ⁵	86,00
MOC14	2,2 x10 ⁶	95,00
MOC15	5,3 x10 ⁶	90,97
MOC16	3,0 x10 ⁵	74,88

MOC: medula óssea controle; ND: não determinado.

Tabela 11: Detecção da mutação JAK2V617F e porcentagem de alelos mutados em pacientes com Policitemia Vera.

AMOSTRAS	MUTAÇÃO JAK2V617F	ALELOS MUTADOS (%)
PV01	(-)	0
PV02	+	13
PV03	+	90
PV04	+	13
PV05	+	87
PV06	+	25
PV07	+	52
PV08	+	50
PV09	+	40
PV10	+	94
PV11	(-)	0
PV12	+	55
PV13	+	77,8
PV14	+	57,5
PV15	(-)	0
PV16	+	57,9
PV17	+	ND
PV18	+	45,9
PV19	+	56,5
PV20	+	70
PV21	+	31,3
PV22	(-)	0
PV23	+	21,6
PV24	+	34,4
PV25	(-)	0
PV26	+	70,3
PV27	+	36,4

PV: Policitemia Vera; ND: não determinado.

Tabela 12: Detecção da mutação JAK2V617F e porcentagem de alelos mutados em pacientes com Trombocitemia Essencial.

AMOSTRAS	MUTAÇÃO JAK2V617F	ALELOS MUTADOS (%)
TE01	+	14
TE02	+	7
TE03	(-)	0
TE04	+	30
TE05	(-)	0
TE06	(-)	0
TE07	(-)	0
TE08	(-)	0
TE09	+	33
TE10	(-)	0
TE11	(-)	0
TE12	+	18
TE13	+	63
TE14	+	30
TE15	+	30
TE16	+	45
TE17	+	35
TE18	+	72
TE19	+	27
TE20	(-)	0
TE21	+	29,4
TE22	(-)	0
TE23	+	30,2
TE24	+	7,7
TE25	(-)	0
TE26	(-)	0
TE27	+	85,2
TE28	(-)	0
TE29	(-)	0
TE30	(-)	0
TE31	(-)	0
TE32	(-)	0
TE33	+	43,9
TE34	+	53,1
TE35	(-)	0
TE36	+	52,5
TE37	+	25,8
TE38	(-)	0
TE39	(-)	0

TE: Trombocitemia Essencial; ND: não determinado.

Tabela 13: Detecção da mutação JAK2V617F e porcentagem de alelos mutados em pacientes com Mielofibrose Primária.

AMOSTRAS	MUTAÇÃO JAK2 V617F	ALELOS MUTADOS (%)
MFP01	+	87
MFP02	(-)	0
MFP03	(-)	0
MFP04	(-)	0
MFP05	(-)	0
MFP06	(-)	0
MFP07	(-)	0
MFP08	+	36
MFP09	+	37
MFP10	+	35
MFP11	(-)	0
MFP12	+	43,8
MFP13	+	26,5
MFP14	+	45,7

MFP: Mielofibrose Primária; ND: não determinado.

IV.3. Parâmetros hematológicos das amostras de sangue periférico dos pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária

O hemograma do sangue periférico dos pacientes foi realizado na mesma data de e processamento da amostra coletada. Os resultados do hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas e aumento do tamanho do baço usados nas análises de correlação estão descritos nas tabelas 14, 15 e 16.

Poucos pacientes com PV apresentaram aumento do tamanho do baço, por essa razão, não foram realizadas as correlações dos dados de expressão de galectinas com esse parâmetro em PV.

Tabela 14: Hematócrito, concentração de Hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas dos pacientes com Policitemia Vera.

AMOSTRA	Ht (%)	Hb (g/dl)	LEUCÓCITOS ($10^3/\text{mm}^3$)	PLAQUETAS ($10^3/\text{mm}^3$)
PV 01	57,0	18,9	8,16	222
PV02	54,7	17,4	5,20	250
PV03	49,5	18,9	8,80	541
PV 04	48,1	17,2	51,0	182
PV 05	50,0	12,1	20,0	568
PV 06	46,6	16,6	8,75	330
PV 07	50,4	16,3	6,50	275
PV 08	52,7	16,4	9,04	412
PV 09	49,4	17,2	9,20	302
PV 10	53,9	16,0	21,3	420
PV 11	61,0	18,0	6,22	543
PV 12	54,0	19,3	8,85	299
PV 13	53,1	18,1	8,98	259
PV 14	49,1	16,6	8,97	181
PV 15	51,6	19,3	9,86	461
PV 16	54,7	19,3	6,82	483
PV 17	48,7	16,7	18,4	605
PV 18	50,7	19,57	3,59	664
PV 19	51,0	17,5	6,35	449
PV20	60,4	19,5	15,70	772
PV21	62,0	21,5	9,70	161
PV22	50,7	18,1	3,60	211
PV23	51,6	18,7	6,23	102
PV24	48,5	15,5	7,34	531
PV25	74,0	22,0	7,92	250
PV26	53,1	17,2	14,20	621
PV27	50,2	18,5	6,40	451

PV: Policitemia Vera; Hb: concentração da hemoglobina; Ht: hematócrito; ND: não determinado

Tabela 15: Hematócrito, concentração de Hemoglobina, contagem de leucócitos, plaquetas e aumento do tamanho do baço dos pacientes com Trombocitemia Essencial.

AMOSTRA	Ht (%)	Hb (g/dl)	LEUCÓCITOS ($10^3/\text{mm}^3$)	PLAQUETAS ($10^3/\text{mm}^3$)	BAÇO (cm)
TE01	30,0	10,0	2,9	628	0
TE02	51,8	16,0	11,1	790	3
TE03	36,3	14,8	5,0	752	5
TE04	39,4	16,2	5,6	725	4
TE05	51,7	20,8	4,6	609	0
TE06	51,7	13,1	3,4	645	3
TE07	43,9	14,2	4,01	927	2
TE08	34,4	11,1	6,54	688	0
TE09	39,5	12,2	5,9	513	1
TE10	43,3	14,9	32	771	1
TE11	39,5	13,5	6,7	625	0
TE12	35,4	11,5	5,19	780	2
TE13	44,9	15,1	9,08	638	2
TE14	45,3	14,8	4,09	274	0
TE15	42,8	13,2	6,99	555	0
TE16	41,6	13,6	5,26	505	0
TE17	41,8	12,8	13,4	1484	0
TE18	45,7	14,8	14,1	1261	0
TE19	41,4	14,0	6,5	544	0
TE20	36,7	11,7	7,42	636	3
TE21	46,9	15,5	12	817	5
TE22	42,9	13,7	7,57	556	0
TE23	39,87	13	7,85	483	0
TE24	48,9	15,6	8,9	529	0
TE25	41,1	13,5	6,69	775	0
TE26	38	12,0	9,0	1062	0
TE27	39,2	11,4	29,4	963	10
TE28	41,1	13,6	6,61	759	0
TE29	45,1	13	4,03	627	0
TE30	37,4	12	4,41	399	0
TE31	39,3	13,1	8,16	983	0
TE32	39,8	17,1	14	809	ND
TE33	55,7	12,5	10,7	917	6
TE34	64,7	22,4	7,42	469	0
TE35	34,6	13,4	15,6	1293	3,74
TE36	38,3	10,1	3,96	438	ND
TE37	38	12,5	4,7	434	ND
TE38	41,6	13,7	10,2	602	ND
TE39	39,6	12,9	5,81	668	0

TE: Trombocitemia Essencial; Hb: concentração da hemoglobina; Ht: hematócrito; ND: não determinado

Tabela 16: Hematócrito, Concentração de Hemoglobina, contagem de leucócitos, plaquetas e aumento do tamanho do baço dos pacientes com Mielofibrose Primária.

AMOSTRA	Ht(%)	Hb (g/dl)	LEUCÓCITOS ($10^3/\text{mm}^3$)	PLAQUETAS ($10^3/\text{mm}^3$)	BAÇO (cm)
MFP01	52,9	15,9	14,2	77	18
MFP02	29,5	9,75	7,96	61,2	16
MFP03	31,8	9,88	2,32	114	5
MFP04	19,2	5,88	2,38	38,5	14
MFP05	32,3	10,3	4,24	252	11
MFP06	48,5	15,5	5,77	339	5
MFP07	37,4	11,9	24,0	117	0
MFP08	39,9	13,1	5,32	280	4
MFP09	26,3	8,62	2,18	71,7	12,5
MFP10	38,3	12,6	6,48	345	0
MFP11	32	9,79	7,16	389	7,6
MFP12	37,7	12,4	4,52	279	5,8
MFP13	28,9	8,97	6,09	196	1
MFP14	30,3	9,6	7,6	991	0

MFP: mielofibrose primária; Hb: concentração da hemoglobina; Ht: hematócrito.

IV.4. Quantificação da expressão de *LGALS1* em leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺ de pacientes com PV, TE e MFP

A detecção dos níveis de expressão de *LGALS1* foi realizada em 27 amostras de leucócitos de sangue periférico e 26 amostras de células CD34⁺ de pacientes PV. Nos pacientes de TE foram analisadas 39 amostras tanto para células CD34⁺ e 37 de leucócitos de sangue periférico. Nos pacientes de MFP foram analisadas 15 amostras para leucócitos de sangue periférico e 14 amostras de células CD34⁺.

Parte das amostras de pacientes utilizadas nos experimentos de expressão gênica pertence ao banco de amostras do nosso grupo de pesquisa e por esta razão três delas (1 amostra de PV, 2 de TE) não apresentaram quantidade suficiente de cDNA para realização dos experimentos do presente estudo. Sendo assim, para a amostra PV18, TE12 e TE13 possuíamos apenas cDNA de leucócitos de sangue periférico. Essa informação justifica a diferença, que pode ser observada nos gráficos, entre o número de amostras analisadas de sangue periférico e medula óssea para os pacientes com PV e TE.

A *LGALS1* apresenta-se *hipoexpressa* em leucócitos de pacientes com MFP (mediana (m)=0,742) em relação aos controles (m=0,968) (p=0,013). Não foi observada diferença de expressão de *LGALS1* em leucócitos de pacientes com PV (m=1,033) e nem em leucócitos de pacientes com TE (m=0,757) em relação ao controle (m=0,968) (Figura 6).

Nas células CD34⁺, a *LGALS1* apresenta-se *hipoexpressa* em pacientes de PV (m=0,623) e em pacientes de MFP (m=0,679) quando comparada ao grupo controle (m=0,963) (p=0,018; p=0,046, respectivamente). Não houve diferença estatística significativa dos níveis de expressão de *LGALS1* em células CD34⁺ de pacientes com TE (m=1,32) em relação aos controles (m=0,963) (Figura 6).

Comparando-se a expressão de *LGALS1* entre as três doenças observa-se diferença significativa entre a expressão de *LGALS1*, em células CD34⁺, entre os pacientes com PV

($m=0,623$) e com TE ($m=1,32$) ($p=0,0001$) e entre os pacientes de TE ($m=1,32$) e de MFP ($m=0,679$) ($p=0,003$) (Figura 6).

Figura 6: Expressão de *LGALS1* em leucócitos de sangue periférico e em células $CD34^+$ de pacientes com PV, TE e MFP. *LGALS1* está *hipoexpressa* em leucócitos de sangue periférico de pacientes com MFP e em células $CD34^+$ de pacientes com PV e com MFP em relação ao grupo controle. *LGALS1* está mais expressa em células $CD34^+$ de pacientes com TE quando comparado à expressão em pacientes com PV e MFP.

IV.5. Expressão de *LGALS3* em leucócitos de sangue periférico e células $CD34^+$ de pacientes com PV, TE e MFP

A análise dos níveis de expressão de *LGALS3* foi realizada em 27 amostras de leucócitos de sangue periférico e 26 amostras de células $CD34^+$ de pacientes PV. Nos pacientes de TE foram analisadas 39 amostras tanto para leucócitos de sangue periférico como para células $CD34^+$. Nos pacientes de MFP foram analisadas 14 amostras para leucócitos de sangue periférico e 13 amostras de células $CD34^+$.

Parte das amostras de pacientes utilizadas nos experimentos de expressão gênica pertence ao banco de amostras do nosso grupo de pesquisa e por esta razão três delas (1 amostra de PV e 2 de TE) não apresentaram quantidade suficiente de cDNA para realização dos experimentos do presente estudo. Sendo assim, para a amostra PV18, TE12 e TE13 possuíamos apenas cDNA de leucócitos de sangue periférico. Essa informação justifica a

diferença, que pode ser observada nos gráficos, entre o número de amostras analisadas de sangue periférico e medula óssea para os pacientes com PV e TE.

LGALS3 apresenta-se *hiperexpressa* em leucócitos de pacientes com TE ($m=3,16$) em relação aos controles ($m=0,87$) ($p<0,0001$). Não foi observada diferença estatística significativa em leucócitos de pacientes com PV ($m=1,2$) e com MFP ($m=0,58$) em relação aos controles ($m=0,87$) (Figura 7).

Em células $CD34^+$ não houve diferença estatística significante para nenhum dos grupos de pacientes. Comparando-se a expressão de *LGALS3* entre as três doenças observa-se diferença significativa entre a expressão *LGALS3* em leucócitos de pacientes com PV ($m=1,23$) e com TE ($m=3,16$) ($p=0,002$) e entre a expressão de *LGALS3*, também em leucócitos, entre os pacientes de TE ($m=3,16$) e de MFP ($m=0,58$) ($p<0,0001$) (Figura 7).

Figura 7: Expressão de *LGALS3* em leucócitos de sangue periférico e em células $CD34^+$ de pacientes com PV, TE e MFP. *LGALS3* apresenta-se *hiperexpressa* em leucócitos de sangue periférico de pacientes TE em relação ao grupo controle. *LGALS3* apresenta-se mais expressa em células leucócitos de pacientes com TE quando comparado à expressão de pacientes PV e MFP.

IV.6. Correlação dos níveis de expressão de *LGALS1* de leucócitos de sangue periférico e células $CD34^+$ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com PV

As análises de correlações foram feitas entre a expressão de *LGALS1* e a expressão dos genes pró-apoptóticos *BAX*, *FAS*, *FAS_L*, *BID* e *BIK* e para os genes anti-apoptóticos *A₁*, *MCL-1*, *BCL-2*, *BCL-X_L*, *CIAP-1*, *CIAP-2* e *C-FLIP*. A figura 8 mostra as correlações nas quais obtivemos valores de p significativos ($p < 0,05$). Todos dados analisados estão relatados na tabela 17. Houve correlação positiva entre os níveis de expressão de *LGALS1* e *BCL-2* ($r=0,329$), gene anti-apoptótico, em células $CD34^+$ de pacientes PV ($p=0,049$). Foram observadas em leucócitos do sangue periférico de pacientes com PV, correlações positivas entre os níveis de expressão de *LGALS1* e os genes pró-apoptóticos *BID* ($r=0,39$; $p=0,009$) e *FAS* ($r=0,449$; $p=0,009$) e entre os genes anti-apoptóticos *A₁* ($r=0,339$; $p=0,041$) e *CIAP-2* ($r=0,366$; $p=0,029$) (Figura 8).

Figura 8: Correlação entre os valores de expressão de $LGALS1$ e dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos e células $CD34^+$ dos pacientes com PV.

IV.7. Correlação dos níveis de expressão de *LGALS1* de leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com TE

Não foram detectadas correlações entre a expressão de *LGALS1* e dos genes pró-apoptóticos *BAX*, *FAS*, *FAS_L*, *BID* e *BIK* e genes anti-apoptóticos *A₁*, *MCL-1*, *BCL-2*, *BCL-X_L*, *CIAP-2*, *CIAP-1* e *C-FLIP* em leucócitos dos pacientes com TE ($p < 0,05$). Todos os dados analisados estão relatados na tabela 17.

IV.8. Correlação dos níveis de expressão de *LGALS1* de leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com MFP

As análises de correlações foram feitas para os genes pró-apoptóticos *BAX*, *FAS*, *FAS_L*, *BID* e *BIK* e para os genes anti-apoptóticos *A₁*, *MCL-1*, *BCL-2*, *BCL-X_L*, *CIAP-2*, *CIAP-1* e *C-FLIP*. A figura 9 mostra as correlações nas quais obtivemos valores de p significativos ($p < 0,05$). Todos os dados analisados estão relatados na tabela 17.

A figura 9 mostra as correlações positivas entre os níveis de expressão de *LGALS1* e o genes anti-apoptóticos *MCL-1* ($r=0,538$) e *CIAP-2* ($r=0,586$) e entre os genes pró-apoptóticos *BID* ($r=0,622$) e *BAX* ($r=0,47$) em células CD34⁺ de pacientes com MFP ($p=0,023$; $p=0,013$, $p=0,008$, $p=0,042$, respectivamente). Em leucócitos de sangue periférico de pacientes com MFP foram detectadas correlações positivas entre o gene pró-apoptótico *BAX* ($r=0,560$) e para os genes anti-apoptóticos *CIAP-2* ($r=0,626$), *CIAP-1* ($r=0,723$) e *FASL* ($r=0,503$) ($p=0,016$; $p=0,005$, $p=0,001$, $p=0,033$, respectivamente).

Figura 9: Correlações entre os valores de expressão de $LGALS1$ e a expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos e células $CD34^+$ dos pacientes com MFP.

Tabela 17- Dados de correlação entre o nível de expressão gênica de *LGALS1* e o de genes reguladores da apoptose em leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺.

Correlação	MOP			SPP		
	PV	TE	MFP	PV	TE	MFP
<i>LGALS1</i> vs <i>A_I</i>	p=0,193 r=-0,176	p=0,235 r=-0,122	p=0,053 r=0,450	p=0,041 r=0,339	p=0,313 r=-0,08	p=0,297 r=-0,156
<i>LGALS1</i> vs <i>BCL-2</i>	p=0,049 r=0,329	p=0,444 r=-0,024	p=0,357 r=-0,107	p=0,415 r=-0,043	p=0,282 r=-0,094	p=0,123 r=0,331
<i>LGALS1</i> vs <i>MCL-1</i>	p=0,437 r=0,032	p=0,128 r=-0,191	p=0,023 r=0,538	p=0,485 r=-0,007	p=0,292 r=-0,090	p=0,431 r=-0,05
<i>LGALS1</i> vs <i>BCL-X_L</i>	p=0,177 r=0,189	p=0,369 r=-0,056	p=0,246 r=0,20	p=0,448 r=0,026	p=0,218 r=-0,128	p=0,074 r=0,406
<i>LGALS1</i> vs <i>BAX</i>	p=0,375 r=-0,065	p=0,497 r=-0,001	p=0,042 r=0,476	p=0,120 r=0,233	p=0,309 r=-0,081	p=0,016 r=0,569
<i>LGALS1</i> vs <i>BIK</i>	p=0,111 r=0,247	p=0,1001 r=-0,214	p=0,368 r=-0,098	p=0,084 r=0,272	p=0,325 r=-0,074	p=0,090 r=0,380
<i>LGALS1</i> vs <i>BID</i>	p=0,319 r=0,096	p=0,099 r=-0,215	p=0,008 r=0,622	p=0,021 r=0,393	p=0,459 r=-0,016	p=0,318 r=0,138
<i>LGALS1</i> vs <i>FAZ</i>	p=0,479 r=-0,01	p=0,208 r=-0,137	p=0,101 r=0,362	p=0,009 r=0,449	p=0,123 r=-0,190	p=0,291 r=0,160
<i>LGALS1</i> vs <i>FASL</i>	p=0,313 r=0,1002	p=0,152 r=0,173	p=0,251 r=0,195	p=0,159 r=0,199	p=0,470 r=0,012	p=0,033 r=0,503
<i>LGALS1</i> vs <i>C-FLIP</i>	p=0,425 r=-0,038	p=0,083 r=-0,232	p=0,084 r=0,389	p=0,058 r=0,309	p=0,470 r=0,012	p=0,455 r=-0,032
<i>LGALS1</i> vs <i>CIAP-1</i>	p=0,447 r=0,027	p=0,424 r=0,032	p=0,473 r=0,019	p=0,397 r=0,052	p=0,187 r=-0,146	p=0,001 r=0,723
<i>LGALS1</i> vs <i>CIAP-2</i>	p=0,0492 r=-0,003	p=0,345 r=0,067	p=0,013 r=0,586	p=0,029 r=0,366	p=0,449 r=0,021	p=0,005 r=0,657

***análise estatística cujo valor de p foi <0,05.**

IV.9. Correlação dos níveis de expressão de *LGALS3* de leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com PV

As análises de correlações foram feitas entre os níveis de expressão dos genes pró-apoptóticos *BAX*, *FAS*, *FAS_L*, *BID* e *BIK* e genes anti-apoptóticos *A_I*, *MCL-1*, *BCL-2*, *BCL-X_L*, *CIAP-2*, *CIAP-1* e *C-FLIP*. A figura 10 relata as correlações cujos valores de p foram p<0,05. Todos os dados analisados estão relatados na tabela 18.

A figura 10 mostra, em leucócitos de pacientes PV, a correlação positiva entre os níveis de expressão de *LGALS3* e *BIK* (r=0,351; p=0,036) e correlação negativa entre os

níveis de expressão de *LGALS3* e *FAS_L* ($r=-0,43$; $p=0,012$), ambos os genes pró-apoptóticos.

Há ainda a correlação negativa entre os níveis de expressão de *LGALS3* e os genes pro-apoptóticos *BAX* ($r=-0,48$) e *BID* ($r=-0,39$) e entre o gene anti-apoptótico *CIAP-1* ($r=-0,41$) em células $CD34^+$ de pacientes com PV ($p=0,005$, $p=0,022$, $p=0,017$, respectivamente).

Figura 10: Correlação entre os valores de expressão de *LGALS3* e dos genes envolvidos na apoptose em células $CD34^+$ dos pacientes com PV.

IV.10. Correlação dos níveis de expressão de *LGALS3* de leucócitos de sangue periférico e células $CD34^+$ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com TE

As análises de correlações foram feitas entre os níveis de expressão dos genes pró-apoptóticos *BAX*, *FAS*, *FAS_L*, *BID* e *BIK* e genes anti-apoptóticos *A₁*, *MCL-1*, *BCL-2*, *BCL-X_L*, *CIAP-2*, *CIAP-1* e *C-FLIP*. A figura 11 mostra as correlações, nas quais os valores de p foram $<0,05$. Todos os dados analisados estão relatados na tabela 18.

A figura 11 mostra as correlações negativas entre os níveis de expressão de *LGALS3* e o gene anti-apoptótico *C-FLIP* ($r=-0,347$) o gene pró-apoptótico *BAX* ($r=-0,304$) em células $CD34^+$ de pacientes com TE ($p=0,015$; $p=0,029$; respectivamente).

Em leucócitos de sangue periférico de pacientes TE, foram observadas correlações negativas entre os níveis de expressão de *LGALS3* e os genes anti-apoptóticos *A₁* ($r=-0,268$) e *CIAP-2* ($r=-0,282$) e entre o gene pró-apoptótico *BAX* ($r=-0,362$) ($p=0,049$; $p=0,04$ e $p=0,011$; respectivamente). E correlações positivas entre os níveis de expressão de *LGALS3* e os genes anti-apoptóticos *MCL-1* ($r=0,33$) e *CIAP-1* ($r=0,39$) ($p=0,02$ e $p=0,006$; respectivamente).

Figura 11: Correlação entre os valores de expressão de *LGALS3* e a expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos e células $CD34^+$ dos pacientes com TE.

IV.11. Correlação dos níveis de expressão de *LGALS3* de leucócitos de sangue periférico e células $CD34^+$ com a expressão de genes envolvidos na apoptose em pacientes com MFP

As análises de correlações foram feitas para os genes pró-apoptóticos *BAX*, *FAS*, *FASL*, *BID* e *BIK* e para os genes anti-apoptóticos *A₁*, *MCL-1*, *BCL-2*, *BCL-X_L*, *CIAP-2*, *CIAP-1* e *C-FLIP*. A figura 12 mostra as correlações, cujos valores de p foram <0,05.

A figura 12 mostra as correlações negativas entre os níveis de expressão de *LGALS3* e o gene anti-apoptótico *C-FLIP* ($r=-0,529$) e os genes pró-apoptóticos *BAX* ($r=-0,797$) e *FAS_L* ($r=-0,476$) em células $CD34^+$ de pacientes com MFP ($p=0,025$; $p=0,0003$; $p=0,042$, respectivamente). Foram detectadas correlações positivas entre os níveis de expressão e *LGALS3* e dos genes anti-apoptóticos *A₁* ($r=0,529$), *MCL-1* ($r=0,463$) e gene pró-apoptótico *FAS* ($r=0,573$) em pacientes ($p=0,025$; $p=0,047$; $p=0,016$; respectivamente).

Figura 12: Correlação entre os valores de expressão de *LGALS3* e a expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos dos pacientes com MFP.

Todos os dados analisados estão na tabela 18.

Tabela 18- Dados de correlação entre dados de expressão gênica de *LGALS3* e genes reguladores da apoptose em leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺.

Correlação	MOP			SPP		
	PV	TE	MFP	PV	TE	MFP
<i>LGALS3</i> vs <i>A_I</i>	p=0,076 r=0,288	p=0,449 r=0,020	p=0,461 r=-0,028	p=0,186 r=0,178	p=0,049 r=-0,268	p=0,025 r=0,529
<i>LGALS3</i> vs <i>BCL-2</i>	p=0,278 r=0,120	p=0,228 r=0,124	p=0,095 r=-0,371	p=0,138 r=-0,217	p=0,274 r=0,098	p=0,329 r=0,129
<i>LGALS3</i> vs <i>MCL-1</i>	p=0,121 r=0,237	p=0,076 r=0,233	p=0,408 r=-0,068	p=0,216 r=-0,157	p=0,02 r=0,330	p=0,047 r=0,463
<i>LGALS3</i> vs <i>BCL-X_L</i>	p=0,348 r=-0,08	p=0,486 r=0,005	p=0,449 r=-0,037	p=0,147 r=-0,209	p=0,467 r=-0,013	p=0,133 r=-0,318
<i>LGALS3</i> vs <i>BAX</i>	p=0,005 r=-0,48	p=0,029 r=-0,304	p=0,0003 r=-0,797	p=0,101 r=-0,252	p=0,011 r=-0,362	p=0,151 r=-0,296
<i>LGALS3</i> vs <i>BIK</i>	p=0,466 r=-0,01	p=0,203 r=-0,136	p=0,123 r=-0,331	p=0,036 r=0,351	p=0,160 r=0,163	p=0,200 r=0,244
<i>LGALS3</i> vs <i>BID</i>	p=0,022 r=-0,39	p=0,079 r=-0,23	p=0,286 r=-0,164	p=0,347 r=0,079	p=0,469 r=0,012	p=0,053 r=0,450
<i>LGALS3</i> vs <i>FAS</i>	p=0,229 r=-0,15	p=0,291 r=-0,090	p=0,098 r=-0,367	p=0,327 r=-0,090	p=0,273 r=-0,099	p=0,016 r=0,573
<i>LGALS3</i> vs <i>FAS_L</i>	p=0,154 r=0,207	p=0,468 r=-0,013	p=0,042 r=-0,47	p=0,012 r=-0,431	p=0,215 r=-0,129	p=0,236 r=0,208
<i>LGALS3</i> vs <i>C-FLIP</i>	p=0,134 r=0,225	p=0,015 r=-0,347	p=0,025 r=-0,52	p=0,100 r=-0,254	p=0,0004 r=-0,519	p=0,163 r=0,283
<i>LGALS3</i> vs <i>CIAP-1</i>	p=0,017 r=-0,41	p=0,309 r=-0,082	p=0,107 r=-0,353	p=0,066 r=-0,296	p=0,0069 r=0,390	p=0,443 r=0,041
<i>LGALS3</i> vs <i>CIAP-2</i>	p=0,337 r=0,088	p=0,314 r=-0,079	p=0,116 r=-0,340	p=0,119 r=0,234	p=0,04 r=-0,282	p=0,345 r=-0,116

***dados nos quais p<0,05.**

IV.12. Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão de *LGALS1* de leucócitos de sangue periférico em pacientes PV, TE e MFP

As análises de correlações foram feitas para os seguintes parâmetros hematológicos: hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e contagem de plaquetas. No caso dos pacientes com TE e MFP analisou-se também as possíveis correlações da expressão das *LGALS1* com o aumento do tamanho do baço.

A figura 13 mostra as correlações nas quais obtivemos resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os dados analisados estão relatados na tabela 19. A figura 13 mostra correlações negativas entre os níveis de expressão de *LGALS1* e contagem de leucócitos de pacientes PV ($r = -0,397$, $p = 0,02$).

Figura 13: Correlação da contagem de leucócitos com os níveis de expressão de *LGALS1* em leucócitos de pacientes com PV.

Tabela 19- Resultados dos testes de correlação entre dados de expressão gênica de *LGALS1* e parâmetros hematológicos e entre porcentagem de alelos mutados.

Correlação	SPP		
	PV	TE	MFP
<i>LGALS1</i> SPP vs Ht	p=0,483 r=-0,008	p=0,340 r=0,068	p=0,368 r=-0,098
<i>LGALS1</i> SPP vs Hb	p=0,241 r=-0,112	p=0,384 r=0,049	p=0,437 r=-0,046
<i>LGALS1</i> SPP vs leucócitos	p=0,02 r=-0,397	p=0,119 r=-0,196	p=0,251 r=-0,195
<i>LGALS1</i> SPP vs plaquetas	p=0,195 r=-0,249	p=0,12 r=-0,189	p=0,024 r=0,467
<i>LGALS1</i> SPP vs tamanho baço	não analisado	p=0,242 r=-0,126	p=0,453 r=-0,035
<i>LGALS1</i> SPP vs %JAK2V671F	p=0,005 r=-0,491	p=0,226 r=-0,082	p=0,058 r=0,423
<i>LGALS1</i> MOP vs %JAK2V671F	p=0,113 r=-0,250	p=0,227 r=-0,126	p=0,168 r=-0,277

***dados nos quais $p < 0,05$.**

IV.13. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e níveis de expressão de *LGALS1* em leucócitos de sangue periférico e em células CD34⁺ de pacientes PV, TE e MFP

As análises de correlações foram feitas para a porcentagem de alelos mutados da mutação V617F do gene da JAK2. Na figura 14 foi observada a correlação negativa entre os níveis de expressão de *LGALS1* e a porcentagem de alelos mutados em pacientes PV ($r=-0,491$; $p=0,005$). Todos os dados analisados estão relatados na tabela 19.

Figura 14: Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e os níveis de expressão de *LGALS1* em leucócitos de pacientes com PV.

IV.14. Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão de *LGALS3* de leucócitos de sangue periférico em pacientes PV, TE e MFP

As análises de correlações foram feitas para os seguintes parâmetros hematológicos: hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e contagem de plaquetas. No caso dos pacientes com TE e MFP foram realizados os testes para detecção das possíveis correlações com a tamanho do baço.

A figura 15 mostra correlação positiva entre os níveis de expressão de *LGALS3* e contagem de leucócitos de pacientes TE ($r=0,269$; $p=0,048$). Todos os dados analisados estão relatados na tabela 20.

Figura 15: Correlação entre os parâmetros hematológicos e os níveis de expressão de *LGALS3* em leucócitos de pacientes com TE.

IV.15. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e os níveis de expressão de *LGALS3* em leucócitos de sangue periférico e em células CD34⁺ de pacientes PV, TE e MFP

As análises de correlações foram realizadas entre a porcentagem de alelos mutados da mutação V617F do gene da Janus Kinase 2 (JAK2) e os níveis de expressão de *LGALS3*. Houve correlação negativa entre os níveis de expressão de *LGALS3* e a porcentagem de alelos mutados em leucócitos de pacientes com MFP ($r=-0,55$, $p=0,02$) (Figura 16). Todos os dados analisados estão relatados na tabela 20.

Figura 16: Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e os níveis de expressão de *LGALS3* em leucócitos de pacientes com MFP.

Tabela 20- Resultados dos testes de correlação entre dados de expressão gênica de *LGALS3* e parâmetros hematológicos e entre porcentagem de alelos mutados.

Correlação	SPP e MOP		
	PV	TE	MFP
<i>LGALS3</i> SPP vs Ht	p=0,302 r=-0,104	p=0,057 r=-0,255	p=0,227 r=-0,217
<i>LGALS3</i> SPP vs Hb	p=0,084 r=-0,272	p=0,138 r=-0,178	p=0,227 r=-0,217
<i>LGALS3</i> SPP vs leucócitos	p=0,335 r=-0,085	p=0,048 r=0,269	p=0,302 r=0,151
<i>LGALS3</i> SPP vs plaquetas	p=0,052 r=0,319	p=0,052 r=0,263	p=0,113 r=-0,345
<i>LGALS3</i> SPP vs tamanho baço	não analisado	p=0,380 r=-0,054	p=0,084 r=0,406
<i>LGALS3</i> SPP vs % JAK2V617F	p=0,289 r=-0,113	p=0,233 r=-0,119	p=0,020 r=-0,55
<i>LGALS3</i> MOP vs % JAK2V617F	p=0,068 r=0,306	p=0,384 r=-0,048	p=0,172 r=-0,272

*dados nos quais $p < 0,05$.

IV.16. Expressão de *LGALS1* em relação presença da mutação JAK2V617F

A análise dos níveis de expressão de *LGALS1* em relação à presença da mutação JAK2V617F foi realizada nos leucócitos de sangue periférico e em células CD34⁺ de pacientes PV, TE, MFP, no grupo total de pacientes e no grupo formado por apenas pacientes com TE e MFP. Grupo total deve ser compreendido como a somatória dos pacientes com TE, PV e MFP divididos apenas em positivos ou negativos para a mutação JAK2 (JAK2V617F).

LGALS1 apresenta-se mais expressa em células CD34⁺ de pacientes com MFP que são negativos para a mutação no gene da JAK2 (m JAK2 negativo =0,85 e m JAK2 positivo=0,52; $p=0,025$) (Figura 17). Nos grupos, *LGALS1* apresenta-se mais expressa em células CD34⁺ do grupo formado por pacientes com TE somados aos com MFP (m JAK2 negativo.=1,33 e m JAK2 positivo =0,89; $p=0,04$) e no grupo formado pela somatória de pacientes com PV, TE e MFP (m JAK2 negativo 1,32 e m JAK2 positivo =0,65; $p=0,0016$) (Figura 17).

Figura 17: Expressão de *LGALS1* em células CD34⁺ de pacientes com MFP, somatória do grupo de pacientes com TE e MFP e de todos os pacientes que foram separados conforme o *status* da mutação JAK2. *LGALS1* apresenta-se *hiperexpressa* em células CD34⁺ de pacientes com MFP JAK2V617F negativos e em células CD34⁺ do grupo total de pacientes negativos para a mutação JAK2V617F.

IV.17. Expressão de *LGALS3* em relação presença da mutação JAK2V617F

A análise dos níveis de expressão de *LGALS3* em relação à presença da mutação JAK2V617F foi realizada nos leucócitos de sangue periférico e em células CD34⁺ de pacientes PV, TE, MFP, no grupo total de pacientes e no grupo formado por apenas pacientes com TE e MFP. Grupo total deve ser compreendido como a somatória dos pacientes com TE, PV e MFP divididos apenas em positivos ou negativos para a mutação JAK2 (JAK2V617F).

LGALS3 apresenta-se mais expressa em células CD34⁺ de pacientes com MFP que são negativos para a mutação no gene da JAK2 (m neg.=0,85 e m posit.=0,52; p=0,025) (Figura 18). Nos grupos, *LGALS3* apresenta-se mais expressa em células CD34⁺ do grupo de

pacientes com TE + pacientes com MFP (m neg.=1,33 e m posit.=0,89; $p=0,04$) e no grupo de pacientes com PV+ grupo de pacientes TE+ grupo de pacientes com MFP (m neg.=1,32 e m posit.=0,65; $p=0,0016$) (Figura 18).

Figura 18: Expressão de *LGALS3* em leucócitos de pacientes com MFP e em leucócitos de todos os pacientes separados em grupos conforme o *status* da mutação JAK2. *LGALS3* apresenta-se *hiperexpressa* em leucócitos de pacientes com MFP JAK2V617F negativos e em leucócitos de pacientes do grupo total de pacientes JAK2V617F negativos.

IV.18. Concentração plasmática de galectina-3 em pacientes com PV, TE e MFP

A galectina-3 plasmática foi quantificada em 18 amostras de pacientes com Policitemia Vera, 21 de pacientes com Trombocitemia Essencial, 13 de pacientes com Mielofibrose Primária e 22 dos controles. As amostras analisadas e as respectivas concentrações de galectina-3 estão listadas na tabela 21.

Pacientes com TE apresentaram mais galectina-3 plasmática (m=10,53) do que os controles (m=7,87; $p=0,0168$). Não foi observada diferença significativa da concentração de galectina-3 plasmática entre os pacientes com PV (m=9,06) e com MFP (m=8,56) em relação aos controles (m=7,87) (Figura 19).

Tabela 21- Pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária, cujas amostras de plasma foram utilizadas e respectivas concentrações de galectina-3.

PACIENTES E CONTROLES	CONCENTRAÇÕES (ng/mL)
PV06	11,71
PV07	5,78
PV08	5,1
PV09	4,91
PV10	8,63
PV11	6,76
PV12	5,51
PV13	13,24
PV15	8,5
PV17	6,12
PV18	8,25
PV19	25,02
PV20	22,73
PV21	14,24
PV22	11,3
PV23	12,93
PV26	13,11
PV27	9,49
TE08	9,10
TE16	12,65
TE17	18,46
TE18	7,31
TE19	7,17
TE20	10,19
TE21	15,03
TE22	11,29
TE23	3,42
TE25	5,92
TE26	10,57
TE27	11,83
TE28	6,63
TE29	21,63
TE30	7,9
TE31	10,53
TE32	5,9
TE33	17,38
TE35	9,13
Continua...	

PACIENTES E CONTROLES	CONCENTRAÇÕES (ng/mL)
TE36	14,31
TE37	12,16
MFP03	11,05
MFP04	8,56
MFP05	11,7
MFP06	13,8
MFP07	4,34
MFP08	5,46
MFP09	9,63
MFP10	3,61
MFP11	3,18
MFP12	1,42
MFP13	7,69
MFP14	12,04
C18	8,87
C20	6,19
C21	9,89
C22	11,67
C23	12,35
C24	16,65
C25	7,1
C26	6,82
C27	9,48
C28	7,64
C29	5,85
C30	4,57
C31	5,30
C32	10,21
C35	11,03
C36	8,1
C37	8,8
C38	8,27
C39	2,9
C40	7,12
C41	4,86
C42	6,8

PV: Policitemia Vera, TE: Trombocitemia Essencial, MFP: Mielofibrose Primária, C: Controle.

Figura 19: Concentração plasmática de galectina-3 em pacientes com PV, TE e MFP. Pacientes com TE apresentam maior concentração de galectina-3 do que os controles.

IV.19. Correlação entre as concentrações de galectina-3 plasmática e os níveis de expressão de genes envolvidos na apoptose em leucócitos de sangue periférico e em células CD34⁺ de pacientes com PV, TE e MFP

As análises de correlações foram feitas para os genes pró-apoptóticos *BAX*, *FAS*, *FAS_L*, *BID* e *BIK* e para os genes anti-apoptóticos *A_I*, *MCL-1*, *BCL-2*, *BCL-X_L*, *CIAP-2*, *CIAP-1* e *C-FLIP*. Todos os dados analisados estão descritos na tabela 22.

A figura 20 relata as correlações, cujos valores de p foram menores que 0,05. Foram observadas as correlações positiva entre as concentrações de galectina-3 plasmática e os níveis de expressão do gene anti-apoptótico *A_I* ($r=0,507$; $p=0,018$) e negativas com os genes pró-apoptóticos *BID* ($r=-0,48$; $p=0,002$) e *FAS* ($r=-0,58$; $p=0,007$) em células CD34⁺ de pacientes com PV. Em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV, foi detectada a correlação positiva entre a expressão do gene anti-apoptótico *BCL-X_L* ($r=0,43$; $p=0,03$) e negativas entre os genes anti-apoptóticos *A_I* ($r=-0,709$; $p=0,005$) e *CIAP-2* ($r=-0,525$; $p=0,012$) e para o gene pró-apoptótico *FAS* ($r=-0,554$; $p=0,008$).

Figura 20: Correlação entre as concentrações de galectina-3 plasmática e os valores de expressão dos genes envolvidos na apoptose em leucócitos e células CD34⁺ dos pacientes com PV e TE.

Tabela 22- Resultados dos testes de correlação entre as concentrações de galectina-3

plasmática e os níveis de expressão de genes reguladores da apoptose em leucócitos de sangue periférico.

Correlação	MOP			SPP		
	PV	TE	MFP	PV	TE	MFP
gal-3 vs A_I	p=0,018 r=-0,507	p=0,279 r=0,135	p=0,066 r=0,481	p=0,0005 r=-0,709	p=0,49 r=0,001	p=0,195 r=0,272
gal-3 vs $BCL-2$	p=0,17 r=-0,23	p=0,427 r=-0,043	p=0,305 r=0,172	p=0,449 r=-0,031	p=0,389 r=-0,064	p=0,293 r=0,174
gal-3 vs $MCL-1$	p=0,404 r=0,063	p=0,306 r=0,116	p=0,478 r=-0,018	p=0,328 r=0,112	p=0,032 r=-0,40	p=0,256 r=0,209
gal-3 vs $BCL-X_L$	p=0,414 r=-0,05	p=0,293 r=-0,126	p=0,374 r=-0,109	p=0,03 r=0,43	p=0,147 r=-0,240	p=0,235 r=-0,230
gal-3 vs BAX	p=0,455 r=0,029	p=0,253 r=-0,153	p=0,105 r=-0,409	p=0,459 r=0,025	p=0,253 r=-0,153	p=0,263 r=-0,202
gal-3 vs BIK	p=0,261 r=0,166	p=0,206 r=-0,188	p=0,137 r=-0,027	p=0,255 r=-0,166	p=0,137 r=-0,249	p=0,189 r=0,279
gal-3 vs BID	p=0,002 r=-0,48	p=0,339 r=-0,096	p=0,268 r=0,209	p=0,056 r=-0,387	p=0,257 r=-0,150	p=0,431 r=0,055
gal-3 vs FAS	p=0,007 r=-0,58	p=0,206 r=0,188	p=0,117 r=0,390	p=0,008 r=-0,554	p=0,098 r=0,293	p=0,137 r=0,342
gal-3 vs FAS_L	p=0,152 r=0,264	p=0,312 r=0,113	p=0,200 r=0,281	p=0,313 r=-0,122	p=0,166 r=-0,222	p=0,348 r=0,125
gal-3 vs $C-FLIP$	p=0,407 r=0,061	p=0,211 r=0,183	p=0,287 r=0,190	p=0,279 r=-0,147	p=0,090 r=0,303	p=0,372 r=0,104
gal-3 vs $CIAP-1$	p=0,378 r=-0,08	p=0,486 r=0,007	p=0,129 r=-0,372	p=0,364 r=0,087	p=0,394 r=-0,062	p=0,389 r=0,09
gal-3 vs $CIAP-2$	p=0,169 r=-0,26	p=0,337 r=-0,188	p=0,478 r=0,018	p=0,012 r=-0,525	p=0,124 r=-0,263	p=0,278 r=-0,188

*dados nos quais $p < 0,05$.

IV.20. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados e as concentrações de galectina-3 plasmática de pacientes PV, TE e MFP

As análises de correlações foram feitas para a porcentagem de alelos mutados da mutação V617F do gene da JAK2. Não foram detectadas correlações entre a percentagem de alelos mutados e a concentração de galectina-3 plasmática em pacientes MFP e TE. Todos os dados analisados estão relatados na tabela 23.

IV.21. Correlação entre os parâmetros hematológicos e as concentrações de galectina-3 plasmática em pacientes com PV, TE e MFP

As análises de correlações foram feitas para os seguintes parâmetros hematológicos: hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e contagem de plaquetas. No caso dos pacientes com TE e MFP analisou-se também as possíveis correlações da concentração plasmática de galectina-3 com o aumento do tamanho do baço.

Não houve resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Todos os dados analisados estão relatados na tabela 23.

Tabela 23- Resultados dos testes de correlação entre concentrações de galectina-3 plasmática e os parâmetros hematológicos e entre porcentagem de alelos mutados.

Correlação	CONCENTRAÇÕES GALECTINA-3		
	PV	TE	MFP
gal-3 vs Ht	p=0,274 r=0,151	p=0,113 r=0,275	p=0,293 r=-0,174
gal-3 vs Hb	p=0,215 r=0,198	p=0,188 r=-0,203	p=0,348 r=-0,125
gal-3 vs leucócitos	p=0,383 r=0,075	p=0,360 r=-0,083	p=0,208 r=-0,258
gal-3 vs plaquetas	p=0,466 r=0,021	p=0,468 r=0,018	p=0,397 r=-0,083
gal-3 vs tamanho baço	não analisado	p=0,716 r=0,359	p=0,473 r=0,022
gal-3 vs %JAK2V671F	p=0,210 r=-0,208	p=0,068 r=0,355	p=0,421 r=0,06

***dados nos quais $p < 0,05$.**

IV.22. Quantificação de galectina-3 plasmática de pacientes com PV, TE e MFP status da mutação JAK2V617F

A análise da quantificação de galectina-3 plasmática em relação à presença da mutação JAK2V617F foi realizada em pacientes PV, TE, MFP, no grupo total dos pacientes separados conforme a positividade para a mutação e no grupo formado por pacientes com TE e MFP. Não foi detectada associação da presença da mutação JAK2 com a concentração da galectina-3 plasmática nos grupos analisados ($p > 0,05$).

IV.23. Análise da expressão protéica de galectina-3 em leucócitos do sangue periférico de pacientes PV, TE e MFP por *Western Blot*

A detecção da proteína Gal-3 foi realizada em leucócitos de pacientes com PV, TE e MFP e controles. A expressão da proteína Gal-3 em leucócitos de pacientes com PV estava semelhante à expressão detectada nos controles (Figura 20). Este resultado foi confirmado pelo cálculo da IDV para cada amostra e a razão da mediana dos IDV entre pacientes e controles encontrando o valor de 0,965.

A expressão da proteína Gal-3 em leucócitos de pacientes com TE também foi semelhante à detectada nos controles (Figura 21). Este resultado foi confirmado pelo cálculo da IDV para cada amostra e a razão da mediana dos IDV entre pacientes e controles encontrando o valor de 0,985.

A expressão da proteína Gal-3 em leucócitos de pacientes com MFP estava menor do que os controles (Figura 22). Este resultado foi confirmado pelo cálculo da IDV para cada amostra e a razão da mediana dos IDV entre pacientes e controles encontrando o valor de 0,443.

Figura 21: Detecção da proteína Gal-3 em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera.

Figura 22: Detecção da proteína Gal-3 em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial.

Figura 23: Detecção da proteína Gal-3 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose Primária.

IV.24. Análise da expressão protéica de galectina-1 em leucócitos do sangue periférico de pacientes com PV, TE e MFP por *Western Blot*

A detecção da proteína Gal-1 foi realizada em leucócitos de pacientes com PV, TE e MFP e indivíduos controle. A expressão da proteína Gal-1 em leucócitos de pacientes com PV apresentou-se maior em relação aos controles (Figura 23). Este resultado foi confirmado pelo cálculo da IDV para cada amostra e a razão da mediana dos IDV entre pacientes e controles encontrando o valor de 4,98.

A expressão da proteína Gal-1 em leucócitos de pacientes com TE mostrou-se aproximadamente igual em relação aos controles (Figura 24). Este resultado foi confirmado pelo cálculo da IDV para cada amostra e a razão da mediana dos IDV entre pacientes e controles encontrando o valor de 1,26.

A expressão da proteína Gal-1 em leucócitos de pacientes com MFP foi maior do que a observada nos controles (Figura 25). Este resultado foi confirmado pelo cálculo da IDV para cada amostra e a razão da mediana dos IDV entre pacientes e controles encontrando o valor de 3,13.

Figura 24: Detecção da proteína Gal-1 em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera.

Figura 25: Detecção da proteína Gal-1 em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial.

Figura 26: Detecção da proteína Gal-1 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose Primária.

IV.25. Compilação dos principais resultados avaliados

Tabela 24- Dados de expressão gênica de *LSGAL1* e *LSGAL3*, detecção da proteína galectina-1 e galectina-3 por W.B. e detecção plasmática de galectina-3 por ELISA.

Análise	PV MOP	TE MOP	MFP MOP	PV SPP	TE SPP	MFP SPP
<i>LGALS1</i>	↓	p>0,05	↓	p>0,05	p>0,05	↓
<i>LGALS3</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	↑	p>0,05
GAL-1 WB	ND	ND	ND	↑	IDV~1	↑
GAL-3 WB	ND	ND	ND	IDV~1	IDV~1	↓
GAL-3 ELISA	ND	ND	ND	p>0,05	↑	p>0,05

PV: Policitemia Vera; TE: Trombocitemia essencial; MPF: Mielofibrose Primária; MOP: medula óssea de paciente; SPP: Sangue periférico de paciente; ND: não determinado, WB: Western Blot; ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; IDV: *Integrated density value*.

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

A Policitemia Vera, a Trombocitemia Essencial e a Mielofibrose Primária são doenças hematológicas de origem clonal classificadas como Neoplasias Mieloproliferativas Clássicas (NMPs), cromossomo Ph negativas. Caracterizam-se pela proliferação exacerbada de células sanguíneas da linhagem mielóide, hipersensibilidade ou independência das células a regulação por citocinas (CAMPBELL, 2006).

Na última década, a descoberta da mutação JAK2V617F, incentivou a realização de estudos que permitam o melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia das NMPs. A mutação V617F acarreta a ativação constitutiva da enzima JAK2 e das vias JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK, RAS que participam de diversos processos biológicos vitais, dentre eles a proliferação e a morte celular (JAMES *et al*, 2005).

Apesar desses achados promissores sobre a associação da patogênese da PV, TE e MFP com a mutação JAK2V617F, 5% dos pacientes com PV e cerca de 50% dos pacientes TE e MFP são negativos para a mutação. São numerosos os indícios de que a PV e a TE sejam estágios iniciais das NMPs que precedem a evolução para a MFP e para leucemia aguda, contudo nenhum estudo comprovou essa teoria.

O acúmulo das células da linhagem mielóide presente nessas doenças parece estar associado às alterações dos processos de apoptose (TOGNON *et al*, 2011) e proliferação celular (JAMES, *et al.*; 2005). Contudo, esses achados não são suficientes para explicar toda a fisiopatologia da doença, indicando que outros mecanismos celulares e moleculares participam da fisiopatologia da PV, TE e MFP.

Nesse contexto, o presente projeto visou à quantificação da expressão de *LGALS1* e *LGALS3* em células precursoras CD34⁺ e leucócitos de pacientes com NMPs com a finalidade de observar a potencial associação dessas lectinas com as alterações da maquinaria apoptótica

e patogênese das NMPs. Os resultados da quantificação da expressão de galectinas foram associados ao tipo de NMP, *status* da mutação V617F (positividade ou negatividade), porcentagem de alelos mutados e genes envolvidos na regulação do processo de apoptose.

Altos níveis de expressão de *LGALS1* têm sido observados em diferentes tipos de células tumorais, tais como em tumores de ovário, pulmão, mama, próstata, bexiga, tireóide, cabeça-pescoço, colo-retal e melanoma (revisado por DEMYDENKO, *et al.*; 2009). Dados de literatura têm associado os altos níveis de expressão de *LGALS1* com a progressão tumoral e com o pior prognóstico da doença (DEMYDENKO, *et al.*; 2009).

O trabalho de WATANABE e colaboradores (2011) relatou a alta expressão de *LGALS1* e elevada concentração de Gal-1 plasmática em pacientes com carcinoma de colo retal. Foi relatado que pacientes com carcinoma de colo retal em estágios mais avançados da doença apresentam maiores níveis de expressão de *LGALS1* e de níveis plasmáticos de Gal-1 quando comparados aos pacientes em estágios iniciais.

No entanto, vale ressaltar que altos níveis de expressão do RNAm das galectinas não são, necessariamente, acompanhados de altos níveis de expressão da proteína. A secreção das galectinas se dá por uma via não clássica, ainda não muito bem compreendida, que independe do sistema de transporte composto pelo retículo endoplasmático e o complexo de golgi, (SATELLI *et al.*; 2007). E, além disso, as funções desempenhadas pelas galectinas estão intimamente associadas a sua localização, intracelular ou extracelular e sua concentração (SCOTT & WEINBERG; 2004).

Nosso trabalho teve como foco a pesquisa da potencial participação das Gal-1 e 3 no processo de apoptose celular em neoplasias mieloproliferativas. A alteração na expressão de moléculas reguladoras da apoptose em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas foi descrita por GASPAROTTO e colaboradores (2009) que detectaram, em células CD34⁺ e em leucócitos de pacientes com PV, alteração da expressão de genes e proteínas anti-apoptóticos

(*BCL-2*, *CIAP-2*, *CIAP-1*, *C-FLIP* e *A1*) e pró-apoptóticos (*NOXA*, *FAS* e *BAX*), especulando a possível desregulação da maquinaria apoptótica na patogênese dessa doença. Além disso, no mesmo estudo, as células mononucleares dos pacientes com PV avaliados apresentaram maior resistência à apoptose induzida por agentes apoptogênicos clássicos do que as células dos controles. Tognon e co-autores (2011) descreveram em TE e MFP a desregulação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose e associaram com a resistência das células a apoptose.

Diversos estudos da literatura objetivaram a compreensão do papel das galectinas, principalmente de Gal-1 e 3 no processo de apoptose (revisado por HSU, *et al.*; 2006). Perillo e colaboradores mostraram que o tratamento de linfócitos T humanos ativados e de linhagem de células leucêmicas T humanas com galectina-1 recombinante foi capaz de induzir o processo de apoptose nessas células (PERILLO, *et al.*; 1995). Em outro estudo, células de linhagem de carcinoma colo retal foram transfectadas com plasmídeo de *LGALS1*. Na população de células que expressava *LGALS1* ocorreu aumento significativo da apoptose, quando comparado ao controle (SATELLI, *et al.*; 2011). No mesmo estudo, os autores verificaram que células transfectadas com plasmídeo de *LGALS1* apresentaram perda do potencial mitocondrial de membrana, diminuição da expressão da molécula anti-apoptótica *BCL-X_L* e ativação de caspases.

STILLMAN *et al.* (2006) relataram que a galectina-1 extracelular foi capaz de induzir diretamente a morte de células T e timócitos por meio de ligantes CD7 na superfície celular dessas células, ativando cascatas de sinalização intracelulares que culminaram com o evento da apoptose (2006).

Cabe aqui observar, diante do exposto, que a indução da apoptose foi promovida tanto por galectina-1 intracelular como pela extracelular. O trabalho de HE & BAUM (2004) reforçou essa observação, descrevendo a indução de apoptose em linfócitos T ativados pela presença galectina-1 na superfície de células estromais dos linfonodos.

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram que *LGALS1* apresenta-se *hipoexpressa* em células CD34⁺ de pacientes com PV. Na análise dos dados de correlação entre os dados de expressão dos genes envolvidos na apoptose celular e *LGALS1* foi detectada a correlação positiva entre a expressão de *LGALS1* e *BCL-2* em células CD34⁺ de pacientes PV. A correlação entre *BCL-2* e expressão de *LGALS1* na PV, não parece ser a responsável pela resistência a apoptose encontrada nas células de pacientes com PV visto que os dados sugerem que Bcl-2, molécula anti-apoptótica, está *hipoexpresso* nestas células. Em outros estudos de nosso grupo, já havíamos detectado dados paradoxais em relação a esta molécula e essa doença mieloproliferativa (GASPAROTTO *et al.*, 2009).

Nosso grupo detectou, em pacientes PV, baixas expressões de *BCL-2* em células leucócitos de pacientes PV e LMC (CASTRO *et al.*, 2005). Apesar de não termos encontrado diferença significativa da expressão de *LGALS1* entre os controles e pacientes com PV em leucócitos, foi verificada a correlação positiva da expressão de *LGALS1* em leucócitos e a expressão dos genes pró-apoptóticos *BID* e *FAS* e entre os anti-apoptóticos *A1* e *CIAP-2*. Poderíamos sugerir que não o Bcl-2, mas outras moléculas reguladoras da apoptose poderiam mediar a resistência a apoptose, por exemplo, moléculas da via extrínseca que não foram profundamente estudadas em nosso trabalho.

Com relação aos resultados obtidos nos pacientes com MFP, os dados mostram que *LGALS1* apresenta-se *hipoexpressa* tanto em leucócitos de sangue periférico como em células CD34⁺ desses pacientes. Os resultados de detecção da proteína Gal-1 por WB não corroboram com os resultados de expressão de RNAm para *LGALS1*. Entretanto, vale ressaltar, que analisamos poucos pacientes de cada doença nos experimentos de WB, sendo, portanto, um dado que precisa ser amplificado para confirmarmos os resultados.

Mesmo diante dos resultados não confirmatórios de WB, os dados para os pacientes com MFP nos pareceram intrigantes já que o grupo de pacientes com MFP é o menor grupo

de pacientes de nosso estudo, com apenas 14 pacientes e mesmo assim, foi o grupo no qual foram observados os dados mais consistentes com relação à expressão de *LGALS1*. Especulamos que, considerando a ação pró-apoptótica já descrita dessa lectina, a baixa concentração de Gal-1 no microambiente hematopoético poderia explicar, em parte, a hiper celularidade e mieloacúmulo verificado na MO e SP dos pacientes com MFP em fase celular. Reforça esse dado o fato dos leucócitos dos pacientes serem extremamente resistentes à apoptose quando estimuladas por agentes apoptogênicos clássicos (TOGNON *et al.*, 2010).

Outro dado importante que parece contribuir para esclarecer a hiper celularidade presente em pacientes com MFP são os dados de correlação entre *LGALS1* e genes reguladores da apoptose. Nossos dados indicam, em células CD34⁺, correlações positivas entre expressão de *LGALS1* e os genes anti-apoptóticos *MCL-1* e *CIAP-2* e em leucócitos há correlações positivas entre expressão de *LGALS1* e os genes anti-apoptóticos *CIAP-1* e *CIAP-2*. O desbalanço da expressão dessas moléculas na MFP pode estar associado à hiperplasia das três linhagens mielóides e às atipias megacariocíticas encontradas nesses pacientes, pois indica inibição da via mitocondrial de apoptose.

Foi observado em nossos resultados que os níveis de *LGALS1* correlacionam-se com a expressão de moléculas reguladoras da apoptose que participam da via intrínseca e da via extrínseca da apoptose, sugerindo que galectina-1 pode interferir tanto na via intrínseca como na via extrínseca da apoptose, como será ilustrado adiante.

Como já comentado, a localização e concentração das galectinas são determinantes em suas funções. VAS e colaboradores (2005) observaram que células de medula óssea, de camundongos e de humanos, tratadas com baixas concentrações (10–20 ng/ml) de galectina-1 recombinante estimularam a formação colônias granulócito-macrófago e eritróides. Por outro lado, concentrações elevadas (5–10 µg/ml) de galectina-1 inibiram o crescimento e amadurecimento de células sanguíneas, atuando como fator pró-apoptótico.

Trabalhos da literatura sugerem ainda a interação da Gal-1 com moléculas reguladoras da apoptose, como o estudo de BRANDT e colaboradores (2008) que relatou em células de linhagem Jurkat-T, derivadas de linfoma T, que Gal-1 tem como alvo o receptor de morte Fas, estimulando a ativação e o processo de proteólise da procaspase-8 e procaspase-3, fragmentação do DNA e consequente apoptose. Nas células Jurkat-T, Gal-1 induziu ainda a clivagem de Bid, molécula pró-apoptótica da família Bcl-2 e liberação de citocromo c da mitocôndria, ativando a cascata de caspases com ativação da pro-caspase-9 e a via mitocondrial (LANGE, *et al.*, 2009).

Rabinovich e colaboradores (2001) mostraram significativa diminuição da expressão de *LGALS1* e aumento da expressão de *BCL-2* em ratos com linfoma tratados por ciclofosfamida quando comparados aos ratos não tratados. Os autores especulam que a expressão de *LGALS1* em células de linfoma seria um mecanismo de escape das células tumorais à resposta imune, pois induziria a apoptose de células T ativadas via Fas e consequente ausência de resposta imune.

Interessante pensar que o gatilho para o início do processo de apoptose pode ser devido a galectina-1 extracelular e sua ligação a receptores específicos expressos nas superfícies celulares, ativando a via extrínseca da apoptose, ou por mecanismo intracelulares no qual galectina-1 intracelular pode interagir com moléculas reguladoras da apoptose, participando então da via intrínseca da apoptose. As figuras 30 e 31 destacam as possíveis ações da Gal-1 no processo de indução da apoptose.

Figura 30- Participação de galectina-1 na maquinaria apoptótica. Adaptado de JIN; 2005.

Figura 31- Participação de galectina-1 na maquinaria apoptótica. Adaptado de ASHKENAZI; 2008.

Em nosso estudo foi realizada a análise da possível associação dos achados de expressão de Gal-1 com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes. Como trabalhamos na interface da pesquisa básica e clínica torna-se relevante a busca de moléculas que denotem a carga tumoral do paciente, marcadores de diagnóstico e prognóstico. Uma das formas de verificar se nosso achado tem associação com a alteração fisiopatológica das NMP previamente conhecida foi avaliar sua associação com a mutação JAK2.

Com relação às associações entre os níveis de expressão de *LGALS1* e os parâmetros hematológicos e *status* da mutação JAK2V617F, foi observada que a expressão *LGALS1* apresenta correlação negativa com as contagens de leucócitos em pacientes PV e correlação negativa com a porcentagem de alelos mutados para a mutação no gene da JAK2.

A mutação da enzima JAK2 divide os pacientes em dois grandes grupos, os positivos ou negativos para a mutação. Na PV, a presença da mutação, além de ser um critério maior para diagnóstico das NMPs, está associada com altas contagens de leucócitos no sangue periférico desses pacientes (VANNUCCHI, *et al.*; 2008).

Com base nos resultados obtidos, especulamos que os baixos níveis de expressão *LGALS1* nos pacientes com PV poderiam contribuir para a resistência a apoptose. Ainda nesse contexto, os pacientes com baixa *LGALS1* seriam exatamente aqueles que apresentam maior carga tumoral, ou seja, alta porcentagem de alelos JAK2 mutados. Essa correlação poderia explicar, em parte, as altas contagens de glóbulos brancos encontradas nos pacientes PV com baixa expressão de *LGALS1*, visto que pacientes JAK2 positivos tem pior evolução do quadro clínico e maiores contagens dos parâmetros hematológicos.

Outro resultado de nosso estudo, que corrobora com os descritos acima, mostra que os níveis de *LGALS1* são mais altos nos pacientes com ausência da mutação no gene da JAK2, tanto nos pacientes com MFP, como no grupo total de pacientes com NMP analisados. A presença da mutação JAK2617F nos pacientes com MFP está associada à idade avançada dos

pacientes, alto hematócrito e leucocitose (revisado por Tefferi, 2012). Diante do exposto podemos pensar que pacientes JAK2V617F negativos apresentam maiores níveis de *LGALS1* e menores contagens de células, sugerindo um quadro laboratorial mais brando.

Cabe aqui discutir ainda sobre as publicações da literatura que propõem a ligação da galectina-1 com vias de sinalização que promovem a neoangiogênese e fibrose já que a fibrose medular é uma das principais características dos pacientes com MFP (HOFFMAN & RAVANDI-KASHANI, 2005). Okano e colaboradores (2010) mostraram em linhagem celular de células epiteliais renais que a *superexpressão* de *LGALS1* acarreta ativação da via de sinalização ERK/MAPK e redução na expressão de colágeno tipo I (COL1), molécula importante para o processo de fibrose. Além disso, o estudo propõe que terapias utilizando galectina-1 podem promover a novas possibilidades de tratamento para a fibrose renal. Esses estudos na literatura mostram a complexidade de funções e atuações que galectina-1 pode apresentar. Seu papel no desenvolvimento da fibrose, por exemplo, seria um estudo muito interessante nos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas já que cerca de 30% dos pacientes com PV e TE progridem para MFP (HOFFBRAND, *et al*; 2001).

Koopmans e co-autores (2012) investigaram o papel das Gal-1 e 3 na modulação da via JAK/STAT, neoangiogênese e fibrose. Esses autores não verificaram associação dos níveis de expressão da Gal-1 com fibrose, mas sim com a neoangiogênese da medula óssea. Neste estudo também foi mostrado *superexpressão* de *LGALS1* em PV, TE e MFP. Notamos que os resultados são controversos já que nossos dados mostram baixa expressão de *LGALS1* em PV e MFP. Porém, devemos ressaltar que foram usadas metodologias diferentes, em nossos experimentos detectamos o RNAm de *LGALS1* e no outro estudo a metodologia foi a imunohistoquímica. Além disso, outro fator extremamente relevante é o contexto celular. Nossos estudos foram feitos em leucócitos de sangue periférico e em células CD34⁺, enquanto que o outro estudo utilizou células nucleadas da medula óssea.

Com relação à expressão de Gal-1 e o ciclo celular, foi mostrado que essa lectina possui ação mitogênica eficaz em diversos tipos celulares como células do baço, linfócitos e células vasculares (LIPSICK, *et al.*; 1980; PITTS, *et al.*; 1981; SANFORD, *et al.*; 1900).

Chung e colaboradores (2012) mostraram que a supressão de *LGALS1*, em linhagem celular de carcinoma de pulmão, promoveu ativação das vias RAS, MAPK e ERK e, conseqüentemente, proliferação celular. As NMPs apresentam acúmulo de células da linhagem mielóide na MO e no SP (DELHOMMEAU *et al.*, 2007) e alterações em vias de sinalização envolvidas no ciclo celular foram descritas (JAMES *et al*, 2005).

Pensando nas NMP e em nossos resultados a contribuição das Gal-1 para a mieloproliferação presente nessas doenças seria devido aos baixos níveis dessa lectina e a participação de gal-1 juntamente com moléculas reguladoras da apoptose nas vias de sinalização desse processo. Além disso, a associação de Gal-1 o *status* da mutação JAK2V617F nos instiga a especular a possível utilização, no futuro, de gal-1 como marcador de prognóstico.

A Gal-3 é o membro da família das proteínas ligantes de β -galactosídeos mais estudado e se apresenta expressa nas superfícies celulares, na matriz extracelular, no citoplasma e no núcleo, no qual participa na regulação de diversos processos biológicos (HENDERSON & SETHI 2009).

Dados da literatura mostraram que o padrão de expressão de *LGALS3* está alterado em carcinomas e que os níveis de expressão se associam a progressão tumoral, formação de metástases e neoangiogênese (revisado por DANGUY *et al*, 2002).

A elevada expressão de *LGALS3* foi relatada em células tumorais e plasma de pacientes com carcinoma hepatocelular, de pâncreas e tiróide, o que indica seu uso como potencial marcador complementar para o diagnóstico dessas neoplasias (FANG, *et al.*; 2011; XIE, *et al.*, 2012; HSU *et al.*, 1999; XU *et al.*, 1995).

Em contraste, no câncer de mama a expressão da Gal-3 está reduzida (IDIKIO *et al.*, 1998). Esses dados paradoxais podem ser explicados pelas diferenças de contexto celular, localização da lectina, estágio de progressão da doença e abordagem metodológica (DANGUY *et al.*, 2002).

Em nosso trabalho a Gal-3 plasmática e a expressão de *LGALS3* em leucócitos de sangue periférico estão elevadas em pacientes com TE em relação ao grupo controle. Esse resultado nos mostra que a elevada quantidade de RNAm de *LGALS3* no interior dos leucócitos está realmente associada a maior produção da proteína pela maquinaria ribossômica e consequente secreção desta para o meio extracelular. Esse dado sugere que a dosagem de galectina-3 plasmática pode ser usada como um marcador biológico diferencial para os pacientes com TE.

Em recente trabalho sobre o envolvimento das galectinas-1 e 3 na modulação da via JAK/STAT em pacientes com NMPs foi mostrado, por imunohistoquímica de biópsia de medula óssea, que *LGALS3* apresenta maior expressão dessa lectina em pacientes com PV (KOOPMANS, *et al.*, 2012). Além disso, os dados de maior expressão de *LGALS3* foram associados a maior expressão de pSTAT5 em pacientes JAK2V617F positivos e ao aumento da densidade microvascular, ou seja neoangiogênese (KOOPMANS, *et al.*, 2012).

Diante dos nossos achados e dos dados expostos pelo trabalho citado acima, devemos notar que são controversos já que nossos dados mostram *superexpressão* de *LGALS3* em TE e os dados da literatura mostram *superexpressão* de *LGALS3* em PV. Contudo, é importante notar que foram usadas metodologias diferentes, em nossos experimentos detectamos o RNAm de *LGALS3* e no outro estudo a metodologia foi a imunohistoquímica. Além disso, o contexto celular também é diferente. Nossos estudos foram feitos em leucócitos de sangue periférico e em células CD34⁺, enquanto que o outro estudo utilizou células nucleadas da medula óssea.

Além do mais, nossos dados indicam correlação positiva entre nível de expressão de *LGALS3* e a contagem de leucócitos em pacientes TE. Perante os nossos achados e o exposto pela literatura, podemos propor que o aumento da expressão de *LGALS3* nos pacientes com TE pode estar relacionado á ativação da via JAK/STAT, o que poderia explicar, em parte, as maiores contagens de leucócitos em pacientes com alta expressão de *LGALS3*.

Buscando compreender o papel de galectina-3 plasmática, que se apresentou aumentada nos nossos pacientes com TE, foi relatado que galectina-3 extracelular tem papel relevante na regulação da resposta imune, migração e adesão celular, angiogênese, megacariocitopoese e apoptose (revisado por Newlaczyl *et al.*, 2011). Além disso, Gal-3 pode ligar-se à superfície celular de N-glicanos e induzir a apoptose de células T de monócitos e de células de tumor durante a evasão da vigilância imunológica, suprimir a produção de IL-5 e inibir a diferenciação dos linfócitos B (revisado por Newlaczyl *et al.*, 2011).

Diante do que foi colocado e considerando nossos dados, sugerimos ainda que o elevado número de megacariócitos e plaquetas (TEFFERI, 2012), resistência a apoptose das células de pacientes com TE e altas contagens de leucócitos nos pacientes com maior expressão de *LGALS3* pode ser decorrente, também, da participação de gal-3 na ativação de vias de sinalização envolvidas na apoptose, no ciclo celular e megacariocitopoese.

Sobre nossos achados em pacientes com MFP, nosso estudo mostrou que pacientes com MFP que são negativos para a mutação JAK2V167F apresentam maiores níveis de expressão de *LGALS3*. Dados de literatura nos contam que a presença da mutação JAK2V617F nos pacientes com MFP se relaciona a um quadro de leucocitose e alta concentração de hematócrito (TEFFERI, 2012). Diante disso e do que já foi relatado sobre a participação de gal-3 em vias de sinalização proliferativas e vias apoptóticas, podemos propor que as altas contagens celulares dos pacientes com MFP JAK2V617F negativos, quando em fase celular da doença, podem ser atribuídas, a alta expressão de *LGALS3* nestes pacientes.

Publicações da literatura apontam para a relação de Gal-3 e fibrose. Koopmans e colaboradores (2012) mostraram associação inversa entre a expressão de *LGALS3* e fibrose em pacientes com mielofibrose. Essa lectina está *superexpressa* nos nossos pacientes com MFP JAK2V617F negativos. Em presença do exposto, sugerimos que a ausência da mutação e a presença de maiores níveis de Gal-3 possa ser um fator protetor para o desenvolvimento da fibrose. Podemos pensar, no futuro, em mais estudos com Gal-3 que descrevam seu potencial como marcador prognóstico e na progressão dos pacientes com PV ou TE para MFP.

Nosso estudo teve como foco a investigação sobre a participação dessas Gal-1 e 3 na morte celular. Sabe-se que diferentes localizações da Gal-3 determinam seus efeitos na sobrevivência ou morte celular. Quando presente intracelularmente, no núcleo, apresenta atividade pró-apoptótica e no citoplasma apresenta efeitos anti-apoptóticos (CALIFICE *et al.*, 2004). Dados da literatura indicam que galectina-3 citoplasmática inibe a apoptose pelo fato de apresentar similaridade com o domínio BH1 da molécula anti-apoptótica Bcl-2, responsável pela regulação da apoptose (AKAHANI *et al.*, 1996).

Nesse trabalho foram detectadas correlações negativas entre a expressão de *LGALS3* e a molécula pró-apoptótica *BAX* em células CD34⁺ de pacientes PV, TE e MFP. A associação com Bax também evidente nas correlações com *LGALS1* em células CD34⁺. Reforçamos, então, a associação de Bax e as galectinas-1 e 3 e a importância dessas moléculas na hiperplasia das três linhagens mielóides.

Nossos resultados em leucócitos de sangue periférico de pacientes com TE e MFP, mostram correlação positiva entre a expressão de *LGALS3* e a molécula anti-apoptótica *MCL-1*. Já nas análises de correlações de concentrações de galectina-3 plasmática de pacientes TE foi observada correlação negativa com a molécula *MCL-1*. A aparente contradição nos resultados com relação à associação ser positiva em um caso e, negativa no outro, pode ser devido às diferentes funções desempenhadas por galectina-3 em suas diferentes localizações,

como já descrito. Diante disso, podemos especular que quando no meio intracelular, galectina-3 poderia atuar como molécula anti-apoptótica já que se correlaciona positivamente com *MCL-1*, molécula também anti-apoptótica. Já no meio extracelular, galectina-3 atuaria como molécula pró-apoptótica, pois se correlaciona negativamente com *MCL-1*. Entretanto, devemos ressaltar que quando no meio intracelular, a localização citoplasmática ou nuclear de galectina também tem implicação em suas funções, como já citado. Sendo assim, para melhor entendimento da atuação de gal-3 em pacientes com TE seria necessário mais estudos buscando localizar intracelularmente onde se encontra gal-3 nas células desses pacientes.

Nosso grupo de pesquisa já descreveu superexpressão de *MCL-1* em pacientes com PV, e, além disso, a resistência das células dos pacientes com NMPs à indutores clássicos da apoptose. Diante do exposto, propomos que a correlação entre *LGALS3* e *MCL-1* estaria associada à resistência a apoptose das células dos pacientes com TE.

Yamamoto-Sugitani e colaboradores (2011) induziram expressão de *LGALS3* em células de diferentes linhagens de Leucemia Mielóide Crônica (LMC). A expressão forçada dessa lectina ativou as vias de sinalização AKT e ERK, induziu expressão de *MCL-1*, promoveu proliferação *in vitro* dessas células e as tornou resistentes a vários inibidores de tirosina-quinase e agentes genotóxicos.

Dados de literatura expõe essa relação entre galectina-3 e moléculas reguladoras da apoptose. Células de linfoma de células T (Jurkat-T) que expressam *LGALS3* sobrevivem mais que as células controle quando submetidas a agentes indutores de apoptose (YANG *et al*, 1996). Em linhagem celular de células endometriais, também foi mostrado a aumento da sobrevivência das células que expressam *LGALS3*. Quando estas células foram expostas ao indutor de apoptose estaurosporina, apresentaram elevação na expressão de *LGALS3*. Além disso, quando *LGALS3* foi silenciada nestas células endometriais, elas se tornaram mais sensíveis ao indutor de apoptose (YANG, *et al.*; 2012).

Huang e colaboradores (2008) investigaram a expressão de *LGALS3* e proteínas da família Bcl-2, *BAX* e *BCL-2*, em células de tumor de glândula pituitária. Os autores mostraram que *LGALS3* e *BCL-2* estavam hiperexpressas nas células de câncer de glândula pituitária invasivo em relação ao grupo não invasivo. Eles sugeriram que Gal-3 inibe as vias de sinalização que envolvem Bcl-2, aumentam a proliferação, resultando em câncer com maior potencial invasivo.

Essas observações reforçam nossa sugestão de que galectina-3 participe no processo de apoptose interagindo, de maneira ainda desconhecida, com as moléculas reguladoras da apoptose.

Em outro estudo, galectina-3 citoplasmática foi capaz de interagir com a proteína sinexina perante estímulos apoptóticos, promovendo a translocação de Gal-3 para a mitocôndria, na qual interage com Bcl-2 bloqueando a alteração do potencial de membrana, liberação de citocromo c e inibindo a apoptose (YU, *et al.*; 2002).

Cheng e colaboradores (2011) buscaram estudar os mecanismos pelos quais células leucêmicas K562 são resistentes à apoptose. Os autores induziram a apoptose por cisplatina nestas células e as células sobreviventes tiveram aumento na expressão de *LGALS3*, não degradação das proteínas anti-apoptóticas *MCL-1* e *BCL-X_L* e aumento da expressão de *BCL-2*. Além disso, o silenciamento de *LGALS3* nas células leucêmicas aumentou a susceptibilidade a apoptose.

É relevante relatar que a utilização de droga antagonista de Gal-3 em cultura de células de mieloma foi capaz de induzir a apoptose pela ativação das caspases 8 e 9 e diminuir os níveis das moléculas anti-apoptóticas *MCL-1* e *BCL-X_L* (STREELY *et al.*, 2010). Dado interessante, visto que indica potencial aplicação clínica para a molécula anti-gal-3.

Autores já relataram que expressão de galectina-3, tanto endógena como exógena, ocorre em ambientes mielóides, como na superfície celular de mieloblastos, de células

mielóides maduras e em células do estroma da medula óssea que se encontram no microambiente mielóide, sugerindo envolvimento dessa lectina na organização dos compartimentos de células da linhagem mielóide. Esses autores também demonstraram que galectina-3 endógena e exógena suprimem a proliferação que é induzida pelo fator estimulador de colônia granulócito-macrófago GM-CSF, sugerindo que esta lectina regula ambientes mielopoéticos possivelmente controlando a disponibilidade de GM-CSF (KRUGLUGER, *et al.*, 1997).

Além disso, a medula óssea de camundongos *knockout* de galectina-3 (Gal-3^{-/-}) foi estudada por BRAND e colaboradores (2011) que mostraram que nestes animais, a histologia da medula óssea foi significativamente modificada apresentando baixa celularidade e grande quantidade de projeções trabeculares em comparação com a histologia dos animais do tipo selvagem. Além disso, nos animais Gal-3^{-/-}, as células mielóides apresentaram capacidade limitada de se diferenciar em populações de células maduras e as células do estroma da medula óssea apresentaram baixos níveis de expressão de GM-CSF. Os autores propõem que galectina-3 interfira na hematopoese, controlando a diferenciação de precursores mielóides via modulação na expressão de GM-CSF.

O papel do microambiente da medula óssea na regulação da hematopoese é de grande valor para o entendimento dos processos fisiológicos e patológicos. Galectina-3 parece ser um alvo importante para futuros estudos. Até o momento, não há estudos de que relacionam galectina-3 e a regulação da megacariopoese.

Diante dos resultados descritos obtidos em nosso trabalho como a expressão diferencial das *LGALS1* e *LGALS3* e maior concentração plasmática de Gal-3 em pacientes com TE seria relevante aprofundar a investigação sobre os mecanismos celulares envolvidos na regulação da apoptose, megacariopoese e fibrose celular nas NMP, sobretudo em pacientes com mielofibrose negativa para a mutação JAK2.

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

1. A *LGALS3* está mais expressa em leucócitos de pacientes com TE do que em pacientes com PV, MFP e controles;
2. Galectina-3 plasmática está em concentração mais elevada em pacientes com TE do que a detectada em pacientes com PV, MFP e controles;
3. *LGALS1* está hipoexpressa em leucócitos e células CD34⁺ de pacientes com MFP em relação aos pacientes com PV, TE e controles;
4. Pacientes negativos para a mutação JAK2, especialmente pacientes com MFP apresentaram expressão diferencial de *LGALS3* e *LGALS1*;
5. Há correlação positiva entre:
 - a) *LGALS1* e *BCL-2* em PV;
 - b) *LGALS1* e *BAX* e *CIAP-2* em MFP;
 - c) *LGALS3* e *MCL-1* em TE e MFP;
 - d) *LGALS3* e contagem de leucócitos em TE.
6. Há correlação negativa entre:
 - a) *LGALS1* e porcentagem de alelos mutados JAK2V617F em PV;
 - b) *LGALS1* e contagem de leucócitos em PV;
 - c) *LGALS3* e porcentagem de alelos mutados JAK2V617F em MFP;
 - d) *LGALS3* e *BAX* em PV, TE e MFP.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD,N., GABIUS, H.J., ANDRÉ, S., *et al.* Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.10841-7, 2004.

AKAHANI S., NANGIA-MAKKER P., INOHARA H. *et al.* Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Research**, v.57, p.5272-5276, 1997.

ASGARIAN-OMRAN, H., FORGHANI, P.,HOJJAT-FARSANGI, M., *et al.* Expression profile of galectin-1 and galectin-3 molecules in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Investigation**, v.28, p. 717-725, 2010.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine Growth Factor Review**. v.19, p.325-31, 2008.

BARONDES, S.H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D.N. *et al.* Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v.76, p. 597–598, 1994.

BAXTER, E.J.; SCOTT, L.M.; CAMPBELL, P.J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK 2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v.365, p. 1054-61, 2005.

BEER, P.A., GREEN, A.R. Pathogenesis and management of essential thrombocythemia. **Hematology American Society Hematological Educacional Program**, p.621-628, 2009.

BENCH, A.J.; PAHJ, H.J. Chromosomal Abnormalities and Molecular Markers in Myeloproliferative Disorders. **Seminars in Hematology**, v.42, p. 196-205, 2005.

BIRON, V.A.; IGLESIAS, M.; TRONCOSO, M.F. *et al.* Galectin-1: biphasic growth regulation of Leydig tumor cells. **Glycobiology**, v.16, p. 810–821, 2006.

BRAND, C., OLIVEIRA, F. L., RICON, L., *et al.* The bone marrow compartment is modified in the absence of galectin-3. **Cell Tissue Research**. v.346, p.427-37, 2011.

BRANDT, B., BÜCHSE T., ABOU-ELADAB E.F., *et al.* Galectin-1 induced activation of the apoptotic death-receptor pathway in human Jurkat T lymphocytes. **Histochemistry and Cell Biology**. v.129, p.599-609, 2008.

BREWER, C. F. Binding and cross-linking properties of galectins. **Biochimica & Biophysica Acta**, v.1572, p. 255-262, 2002.

BRUMATTI, G.; WEINLICH R.; CHEHAB, C.F. *et al.* Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. **FEBS Letter**, v.541, p.57-63, 2003.

CALIFICE S., CASTRONOVO V., BRACKE M. *et al.* Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene**, v.23, p. 7527–7536, 2004.

CAMPBELL, P.J., GREEN, A.R. The myeloproliferative disorders. **The New England Journal of Medicine**, v.7, p.2452-2466, 2006.

CAY, T. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: a review of the literature. **Türk patoloji derg.** v.28, P.1-10, 2012.

CHAUFFAILLE, M.L.F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, p. 308-316, 2010.

CHENG, Y.L., HUANG, W.C., CHEN, C.L., *et al.* Increased galectin-3 facilitates leukemia cell survival from apoptotic stimuli. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.26, p.334-40, 2011.

CHUNG, L.Y., TANG, S.J., SUN, G.H., *et al.* Galectin-1 Promotes Lung Cancer Progression and Chemoresistance by Upregulating p38 MAPK, ERK, and Cyclooxygenase-2. **Clinical Cancer Research**. v.18, p. 4037-4047, 2012.

CORREA, P.N.; ESKINAZZI, D.; AXELRAD, A.A. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 *in vitro*: studies in an improved serum-free medium. **Blood**, v.83, p. 99–112, 1994.

DELHOMMEAU, F.; DUPONT, S.; TONETTI, C.; *et al.* Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. **Blood**, v.109, p. 71–77, 2007.

DELHOMMEAU, F., JEZIOROWSKA, D., MARZAC, C., *et al.* Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. **International Journal of Hematology**. v.91, p.165–173, 2010.

DAI, C.; CHUNG, I.J.; KRANTZ, S.B. Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt / PKB. **Experimental Hematology**, v.33, p. 152–8, 2005.

DANGUY A., CAMBY I., KISS R.; Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1572, P.285-293, 2002.

DEMYDENKO, D.; BEREST, I. Expression of galectin-1 in malignant tumors. **Experimental Oncology**, v.31, p. 74–79, 2009.

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; CHO M., *et al.* Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without Inducing Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**. v.278, p. 41282–41293, 2003.

ELAD-SFADIA, G.; HAKLAI, R.; BALAN, E. *et al.* Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p. 34922-34930, 2004.

ELLERHORST, J., TRONCOSO, P., XU, X.C., *et al.* Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. **Urological Research**, v.27, n.5, p.362-367, 1999.

ELOLA, M.T., WOLFENSTEIN-TODEL, C., TRONCOSO, M.F., *et al.* Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. **Cellular and Molecular Life Science**. v.64, p.1679-700, 2007.

FANG, Q.Q., NI, R.Z., XIAO, M.B., *et al.* Serum and tissue expressions of galectin-3 in hepatocellular carcinoma and the clinical significances. (2011) doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2011.07.014.

FUKUMORI, T.; TAKENAKA, Y.; YOSHII, T. *et al.* CD29 and CD7 mediate galectin-3 induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Research**, v.63, p. 8302-8311, 2003.

GASPAROTTO, E. P. L. Expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticas em células precursoras da medula óssea e leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de policitemia vera. 2009. 185f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

GILLENWATER A., XU X.C., EL-NAGGAR A.K., *et al.* Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**. v.18, p.422-32, 1996.

GOLDRING, K.; JONES, G.E.; THIAGARAJAH, R., *et al.* The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts *in vitro*. **Journal of Cell Science**, v.115, p. 355-366, 2002.

GREEN, A.R. Pathogenesis of Polycythemia vera. **Lancet**, v.347, p. 844–845, 1996.

HARJACEK M., DIAZ-CANO S., DE MIGUEL M., *et al.* Expression of galectins-1 and -3 correlates with defective mononuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. **Journal of Rheumatology**. v.8, p.1914-22, 2001.

HENDERSON, N.C., SETHI, T. The regulation of inflammation by galectin-3. **Immunology Review**., v.230, p.160-71, 2009.

HE, J., BAUM, L.G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. **The Journal of Biological Chemistry**. v.279, p.4705-471, 2004.

HOFFMAN, R.; RAVANDI-KASHANI, F. Idiopathic myelofibrosis. **In hematology: basic principles and practice**, Hoffman et al., Elsevier Churchill Livingstone, fourth edition, Philadelphia, USA, 2005.

HOFFMAN, R.; RONDELLI, D. Biology and Treatment of Primary Myelofibrosis. **The Education Program of the American Society of Hematology**, p. 346-354, 2007.

HONJO, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H., *et al.* Down-Regulation of Galectin-3 Suppresses Tumorigenicity of Human Breast Carcinoma Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p.661-668, 2001.

HSU, D.K., YANG RY, LIU FT. Galectins in apoptosis. **Methods of Enzymology**., v.417, p. 256-273, 2006.

HSU, D.K., DOWLING, C.A., JENG, K.C. *et al.* Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer**., v.81, p.519-26, 1999.

HUANG, C.X., HOU, Y.H., LIU, Y.S. Expression of galectin-3 correlates with apoptosis in pituitary adenoma cells. **Neuroscience Bulletin**., v.24, p. 34-38, 2008.

IDIKIO, H. Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade. **International Journal of Oncology**.v.12, p.1287-90, 1998.

JAMES, C.; UGO, V.; COUÉDIC, J.P. *et al.* A unique clonal JAK 2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. **Nature**, v. 434, p. 1144–1148, 2005.

JIN, Z., EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p. 139 – 163, 2005.

JOHANSSON, P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 32, p. 171–173, 2006.

KAWASAKI, H.; NAKANO, T.; KOHDERA, U. *et al.* Hypersensitivity of megakaryocyte progenitors to thrombopoietin in essential thrombocythemia. **American Journal of Hematology**, v. 68, p. 194-197, 2001.

KIM, J.; HADDAD, R.Y.; ATALLAH, E. Myeloproliferative Neoplasms. **Disease a month**, v.58, p.177-194, 2012.

KOOPMANS, S.M., BOT, F.J., SCHOUTEN, H.C., *et al.* The involvement of Galectins in the modulation of the JAK/STAT pathway in myeloproliferative neoplasia. **American Journal of Blood Research**, v.2, p.119-27, 2012.

KRUGLUGER, W., FRIGERI, L.G., LUCAS, T., *et al.* Galectin-3 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-driven rat bone marrow cell proliferation and GM-CSF-induced gene transcription. **Immunobiology**, v. 197, p. 97-109, 1997.

KRALOVICS, R.; BUSER, A.S.; TEO, S.S. *et al.* Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 102, p. 1869–1871, 2003.

LANGE F., BRANDT B., TIEDGE M. *et al.* Galectin-1 induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway: evidence for a connection between death-receptor and mitochondrial pathways in human Jurkat T lymphocytes. **Histochemical Cell Biology**, v.132, p.211-23, 2009.

LEFFLER, H., CARLSSON S., HEDLUND M. *et al.* Introduction to galectins. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 433–440, 2004.

LEFFLER, H. Galectins structure and function—a synopsis. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 33, p. 57–83, 2001.

LEVINE, R.L.; WADLEIGH, M.; COOLS, J., *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, p. 387-397, 2005.

LEVINE, R.L.; BELISLE, C.; WADLEIGH, M., *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, p. 4139-4141, 2006.

LEVINE, R.L.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A., *et al.* Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nature Reviews. Cancer.**, v. 7, p. 673 – 683, 2007.

LI, Y.; KOMAI-KOMA. M.; GILCHRIST, D.S., *et al.* Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 2781-2789, 2008.

LIU, F.T., PATTERSON, R.J., WANG, J.L., *et al.* Intracellular functions of galectins. **Biochimical and Biophysical Acta**, v. 19, p.263-73, 2002.

LIU, L., SAKAI, T., SANO, N. *et al.* Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. **Biochemical Journal**. v. 380, p. 31-41, 2004.

LIPSICK, J.S., BEYER, E.C., BARONDES, S.H., *et al.* Lectins from chicken tissues are mitogenic for thy-1 negative murine spleen cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 97, p. 56–61, 1980.

LOTAN, R.; BELLONI P.N.; TRESSLER, R.J., *et al.* Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. **Glycoconjugate Journal**, v. 11, p. 462-468, 1994.

LUTOMSKI, D.; FOUILLIT, M.; BOURIN, P., *et al.* Externalization and binding of galectin-1 on cell surface of K562 cells upon erythroid differentiation. **Glycobiology**, v.7, p. 1193-1199, 1997.

MATARRESE, P., TINARI, N., SEMERARO, M.L., *et al.* Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. **FEBS Letter.**, v.473, p. 311–315, 2000.

MOLITERNO, A.R.; HANKIS, D.; SPIVAK, J.L. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 572–580, 1998.

NEWLACZYL, A.U., YU, L.G. Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer. **Cancer Letter**. v. 27, p. 123-128, 2011.

NORLING, L.V., PERRETTI, M., COOPER, D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. **Journal of Endocrinology**, v. 201, p.169-84, 2009.

OKANO, K., TSURUTA, Y., YAMASHITA, T., *et al.* Suppression of renal fibrosis by galectin-1 in high glucose-treated renal epithelial cells. **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 3282-91, 2010.

PACIENZA, N.; POZNER, R.G.; BIANCO, G.A., *et al.* The immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1 triggers human platelet activation. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 1113-1123, 2008.

PERILLO, N.L.; PACE, K.E.; SEILHAMER, J.J., *et al.* Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v. 378, p. 736-739, 1995.

PIKMAN, Y.; LEE, B.H.; MERCHER, T., *et al.* MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLoS medicine**, v. 3, p. 1140-1151, 2006.

PITTS, M.J., YANG, D.C.H. Mitogenicity and binding properties of β -galactoside-binding lectin from chick-embryo kidney. **Biochemical Journal**, v. 195, p. 435–439, 1981.

RABINOVICH, G.A., RUBINSTEIN, N., MATAR, P., *et al.* The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 50, p.597-603, 2001.

RUGGERI, M.; FINOTTO, S. FORTUNA, S. *et al.* Treatment outcome in a cohort of young patients with polycythemia vera. **Internal and Emergency Medicine**, 2010. In Press <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20607450>

SACCHETTINI, J.C.; BAUM, L.G.; BREWER, C.F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**, v. 13, p. 3009-3015, 2001.

SANFORD, G.L., HARRIS-HOOKER, S. Stimulation of vascular cell proliferation by β -galactoside specific lectins. **FASEB J**, v. 4, p. 2912–2918, 1990.

SATELLI, A., RAO, P.S., GUPTA, P.K., *et al.* Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. **Oncology Reports**, v.19, p. 587-94, 2008.

SATELLI, A., RAO, U.S. Galectin-1 is silenced by promoter hypermethylation and its re-expression induces apoptosis in human colorectal cancer cells. **Cancer Letter**, v. 301, p.38-46. 2011.

SATO, S., OUELLET, N., PELLETIER, I. *et al.* Role of Galectin-3 as an Adhesion Molecule for Neutrophil Extravasation During Streptococcal Pneumonia. **Journal of Immunology**, v.168, p. 1813-1822, 2002.

SCOTT K., WEINBERG C. Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation. **Glycoconjugate Journal**.v. 19, p.467-77, 2004.

SCOTT, L.M.; TONG, W.; LEVINE, R.L *et al.* JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 459-68, 2007.

SILVA, M.; RICHARD, C.; BENITO, A., *et al.* Expression of Bcl-xl in erythroid precursors from patients with polycythaemia vera. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 564-571, 1998.

SILVER, R.T.; BENNETT, J.M.; GOLDMAN, J.M. *et al.* The Third International Congress on Myeloproliferative and Myelodysplastic Syndromes. **Leukemia Research**, v. 31, p.11-17, 2007.

SPANOUidakis, E.; TSATALAS, C. Hemopoiesis in Ph-Negative Chronic Myeloproliferative Disorders. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v.2, p. 154-160, 2009.

SPIVAK, J.L. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. **Seminars in Hematology**, v. 41, p. 1-5, 2004.

STILLMAN, B.N., HSU, D.K., PANG, M., *et al.* Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. **Journal of Immunology**. v.176, p.778-89, 2006.

STOWELL S.R., KARMAKAR S., ARTHUR C.M., *et al.* Galectin-1 induces reversible phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. **Molecular Biology of the Cell**, v.20, p.1408-18, 2009.

STREELY, M.J.; MARAJAH, L.; JOEL, S., *et al.* GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. **Blood**, v. 115, p. 3939-3948, 2010.

SWERDLOW, S. H. *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. Lyon, France: IARC; 2008.

TAKENAKA, Y.; INOHARA, H.; YOSHII, T., *et al.* Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. **Cancer Letters**, v. 195, p. 111-119, 2003.

TEFFERI, A.; MURPHY, S. Current opinion in essential thrombocythemia: pathogenesis, diagnosis, and management. **Blood Reviews**, v. 15, p. 121-131, 2001.

TEFFERI, A.; THIELE, J.; ORAZI, A., *et al.* Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. **Blood**, v. 110, p. 1092-1097, 2007.

TEFFERI, A., SKODA, R., VARDIMAN, J.W. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 6, p. 627-37, 2009.

TEFFERI, A. Myeloproliferative Neoplasms 2012: The John M. Bennett 80th birthday anniversary lecture. *Leuk. Res* (2012). <http://dx.doi.org/10.106/j.leukres.2012.08.011>

TEMERINAC, S.; KLIPPEL, S.; STRUNCK, E., *et al.* Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. **Blood**, v. 95, p. 2569-2576, 2000.

TOGNON, R.; GASPAROTTO, E. P.; LEROY, J.M., *et al.* Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in chronic myeloproliferative diseases. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, p. 75-82, 2010.

VAINCHENKER, W., DELHOMMEAU, F., CONSTANTINESCU, S.N., *et al.* New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, p. 1723-35, 2011.

VANNUCCHI, A.M.; ANTONIOLI, E.; GUGLIELMELLI, P., *et al.* Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. **Leukemia**, v. 22, p. 1299-1307, 2008.

VAN DEN BRÛLE, F., CALIFICE, S., CASTRONOVO, V. Expression of galectins in cancer: a critical review. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 537-42, 2004.

VAN ETEN, R.A.; SHANNON, K.M. Focus on myeloproliferative diseases and myelodysplastic syndromes. **Cancer Cell**, v. 6, p. 547-552, 2004.

VARDIMAN, J.W.; HARRIS, N.L.; BRUNNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, p. 2292-2302, 2002.

VAS, V.; FAJKA-BOJA, R.; ION, G., *et al.* Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. **Stem Cells**, v.23, p.279-87, 2005.

WADLEIGH, A.; TEFFERI, A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. **International Journal of Hematology**, v. 91, p. 174-179, 2010.

WATANABE, M., TAKEMASA, I., KANEKO, N., *et al.* Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. **Oncology Reports**, v. 25, p. 1217–1226, 2011.

YAMAMOTO-SUGITANIA, M., KURODAA, J., ASHIHARAC, E., *et al.* Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, v.108, p. 17468-73, 2011.

YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**., v. 21, p. 35–56, 2005.

YANG, R.Y.; HSU, D.K.; LIU, F.T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 93, p. 6737-6742, 1996.

YANG, R.Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. 1-24, 2008.

YANG, H., LEI, C., CHENG, C., *et al.* The Anti-Apoptotic Effect of Galectin-3 in Human Endometrial Cells under the Regulation of Estrogen and Progesterone. **Biology of Reproduction**, v.87, 2012.

YON, M. A. C. Expression of galectin-1 and -3 in Chronic Myeloid Leukemia and its contribution to disease progression. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo:Universidade de São Paulo, 2009.

YU, F., FINLEY, R.L., RAZ, A., *et al.* Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277 p. 15819–15827, 2002.

XIE, .L, NI, W.K., CHEN, X.D., *et al.* The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**., v.138, p.1035-1043, 2012.

XU, X.C., EL-NAGGAR, A.K., LOTAN, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. **American Journal of Pathology**. v. 147, p.815-22, 1995.

ZHANG, L.; ZHAO, H.; SUN, A. *et al.* Early down-regulation of Bcl-xL expression during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-induced CD34⁺ bone marrow cells in essential thrombocythemia. **Haematologica**, v. 89; p. 1199-1206, 2004.

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

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

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 10 de novembro de 2010

Ofício nº 3789/2010
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“EXPRESSÃO DE GALECTINAS 1 E 3 EM DOENÇAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 314ª Reunião Ordinária realizada em 08/11/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 10374/2010.

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

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

Atenciosamente.

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

Ilustríssimas Senhoras

LÍVIA GONZAGA MOURA

PROFª DRª FABÍOLA ATTÍE DE CASTRO (Orientadora)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do paciente _____ Idade _____
Responsável Legal _____
Documento de identidade do Paciente _____

Título da Pesquisa: Expressão das Galectinas 1 e 3 em Doenças Mieloproliferativas Crônicas

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

Pesquisadora responsável: mestranda Livia Gonzaga Moura do departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da FCFRP-USP

Justificativa, Objetivos e Procedimentos do Projeto

Você foi admitido no hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, para tratamento de sua doença mieloproliferativa (Policitemia Vera ou Trombocitemia Essencial ou Mielofibrose) que leva a um aumento do número de células sanguíneas (glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas). Esse aumento de células deixa o sangue mais espesso (grosso, viscoso), dificultando assim a circulação nas veias do nosso corpo. As causas do aparecimento dessas doenças e de sua evolução são desconhecidas, sendo assim esta pesquisa tem como objetivos: 1) estudar o porquê do acúmulo de células vermelhas, brancas e plaquetas no sangue dos pacientes; 2) pesquisar alguns componentes das células do sangue chamados de galectinas que podem ter relação com as características malignas dessas células. O melhor conhecimento sobre estes componentes celulares e sobre as possíveis causas dessas doenças poderá no futuro ajudar no desenvolvimento de melhores tratamentos.

A função deste termo é convidá-lo a participar dessa pesquisa. Caso você aceite, terá que doar 40ml de sangue venoso e 20 ml de medula óssea. A colheita de sangue e medula será realizada por profissionais capacitados (enfermeiros e médicos) com material descartável para que não haja riscos de contaminação. Os riscos dessa colheita serão mínimos, existindo uma pequena chance de aparecimento de inchaço e dor no braço para a colheita de sangue e também dor e tontura no caso da medula. Todas as informações sobre sua condição médica e exame serão mantidas em segredo. Seu sangue e sua medula óssea serão armazenados no freezer e serão utilizadas apenas para essa pesquisa.

Os resultados do estudo serão armazenados em arquivos sem identificação e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação literária. Sempre que você desejar podemos lhe informar os resultados da pesquisa.

Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá retirar-se do estudo quando quiser. Caso você não queira participar os cuidados médicos que irá receber não serão afetados.

Declaro que concordei voluntariamente em participar no projeto de pesquisa acima referido, e fui devidamente informado em detalhes pelos responsáveis do projeto sobre os meus direitos, tais como:

1. A garantia de receber a resposta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa da qual participei;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado, medicação e tratamento médico;
3. A segurança de que não serei identificado(a) e de que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
4. O compromisso de receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha participação no mesmo, bem como conhecer os resultados de todos os exames laboratoriais realizados
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Nome do pesquisador responsável pelo estudo: _____

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 do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: (16) 3602-1000- Fax: (16) 3633-1144.

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

Telefone Profª Fabíola Attié de Castro: (11) 8182-9203 ou (16) 3602-4220

Telefone Serviço de Hematologia: (16) 3602-2294