UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Células estromais mesenquimais multipotentes em neoplasias mieloproliferativas: caracterização fenotípica, molecular e funcional

Juçara Gastaldi Cominal

Ribeirão Preto 2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Células estromais mesenquimais multipotentes em neoplasias mieloproliferativas: caracterização fenotípica, molecular e funcional

> Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

> Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

> Orientada: Juçara Gastaldi Cominal Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro Coorientadora: Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 05/07/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

> Ribeirão Preto 2019

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.

Cominal, Juçara Gastaldi

Células estromais mesenquimais multipotentes em neoplasias mieloproliferativas: caracterização fenotípica, molecular e funcional. Ribeirão Preto, 2019. p.168: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências e Biotecnologia. Orientador: Castro, Fabíola Attié de.

1. Neoplasias mieloproliferativas. 2. Células estromais mesenquimais multipotentes. 3. Oncoinflamação. 4. Neoangiogênese. 5. Apoptose. 6. Microambiente medular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juçara Gastaldi Cominal

Células estromais mesenquimais multipotentes em neoplasias mieloproliferativas: caracterização fenotípica, molecular e funcional.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências e Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Contou também com os auxílios financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processos números #163064/2018-1 e #169093/2018-2; e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) INCTC 2014/50947-7 e CTC #2013/08135-2.

Dedicatória

Ao Ariel, meu marido e melhor amigo, obrigada por todo o amor, apoio e suporte em mais uma jornada.

П



À minha orientadora Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, pela oportunidade em ser membro de seu grupo de pesquisa, ensinamentos, confiança, paciência e pelos laços criados antes mesmo de eu me tornar sua orientada.

À minha coorientadora Profa. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, pela abertura e acolhimento do seu grupo de pesquisa, ensinamentos e confiança.

As amizades criadas no desenvolvimento deste projeto, que foram as minhas companheiras de laboratório e nos tempos livres, por toda a experiência trocada, ajuda e o carinho, Maria Gabriela, Maira, Keli, Nádia e Sandra.

Aos queridos membros do Laboratório de Cultura Celular, do Hemocentro de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP), Amanda, Júlia, Mário, Rafael, Maynara, Marianna, Lucas, Rafaela e João, por me fazerem sentir em casa e toda a ajuda prestada, o meu sincero agradecimento.

Aos médicos e colaboradores clínicos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FMRP/USP), em especial a Profa. Dra. Belinda Pinto Simões, a Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues e a Profa. Dra. Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes, pelo recrutamento dos voluntários deste estudo.

Às importantes colaborações que auxiliaram no desenvolvimento de partes do nosso estudo: a Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley (FCFRP-USP), a Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz (FCFRP-USP), a Dra. Simone Haddad Kashima (Centro Regional de Hemoterapia do HC/FMRP-USP), o Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior (FMRP-USP) e o Dr. Hans-Jochem (Kolb Consulting, Munique/Alemanha).

Ao Centro de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP), coordenado pelo Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, pelo suporte e infraestrutura durante a realização deste estudo.

À Camila Menezes, Patrícia Viana e Natália Aydar, do Laboratório de Citometria do Hemocentro de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP), pela ajuda e apoio nos meus experimentos.

À Carmen, Dalva e Renata, por todo o suporte institucional prestado no Hemocentro de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP).

Aos membros do Laboratório de Hematologia, Luciana e Solange pelo apoio nas realizações de minhas atividades.

A Giuliana Bertolino, Yann Lamarre, Evandra Sandoval e José Orestes Ciampo, pelo auxílio e ensinamentos cruciais para a realização de meu projeto. Ao Henrique Theodoro, Ana Lúcia Turatti, Rosana Florêncio pelo suporte institucional na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

À minha família amada, que são a minha base, força e exemplo, e que sempre compreenderam minhas ausências, em especial ao meu marido, Ariel, meus pais, Rozana e Hamilton, meu irmão e cunhada, Pedro e Juliana, e minha sogra Maria Aparecida.

Às amigas de longas datas: Joyce, Juliana R., Mariellen e Mariana S. que me apoiaram desde o começo da vida acadêmica e pesquisa.

Aos voluntários que concordaram em participar desta pesquisa, que doaram suas amostras mesmo em um momento delicado e permitiram a realização deste estudo, muito obrigada.

A Deus, a minha gratidão eterna.



"The scientist is not a person who gives the right answers; he's one who asks the right questions". Claude Lévi-Strauss

RESUMO

COMINAL, J.G. Células estromais mesenquimais multipotentes em neoplasias mieloproliferativas: caracterização fenotípica, molecular e funcional. 2019. 167f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose (MF) são neoplasias mieloproliferativas (NMP) caracterizadas por proliferação exacerbada de células mieloides maduras e seus precursores na medula óssea e sangue periférico. A fisiopatologia das NMP está associada a presença de mutações iniciadoras nos genes JAK2, CALR e MPL, alterações epigenéticas e do microambiente medular. As células estromais mesenquimais multipotentes (MSC) são essenciais para a manutenção e desenvolvimento do microambiente medular. As MSC são capazes de secretar numerosas moléculas imunomodulatórias, fatores pró-angiogênicos e de crescimento. Pelo exposto, o presente trabalho teve como objetivos principais caracterizar e avaliar funcionalmente as MSC isoladas da medula óssea de pacientes com PV, TE e MF e determinar no microambiente medular desses pacientes o perfil de citocinas, quimiocinas e fatores pró-angiogênicos. Os resultados indicaram que as MSC de NMP são similares às MSC de indivíduos saudáveis quanto ao perfil imunofenotípico e multipotencialidade. Contudo, as MSC de pacientes com NMP se expandem mais lentamente e são de difícil estabelecimento in vitro em comparação com as MSC obtidas de medula óssea normais. Na PV, as MSC são mais resistentes à morte celular, apresentam níveis aumentados da expressão do gene antiapoptótico BIRC2 e menor potencial imunomodulatório. O microambiente medular dos pacientes com NMP apresentou perfil oncoinflamatório, caracterizado pela elevação dos níveis de citocinas, quimiocinas inflamatórias e fatores pró-angiogênicos, principalmente nos pacientes com PV. Em conjunto, os resultados obtidos indicam alteração do microambiente medular nas NMP. Estas alterações no nicho medular têm potencial para interferir no processo de hematopoese, neoangiogênese e na interação célulacélula/célula-estroma medular, contribuindo assim para o desenvolvimento de um microambiente pró-tumoral e na patogênese das NMP.

Palavras-chave: Neoplasias mieloproliferativas; células estromais mesenquimais multipotentes; oncoinflamação; neoangiogênese; apoptose; microambiente medular.

ABSTRACT

COMINAL, J.G. **Multipotent mesechymal stromal cells from myeloproliferative neoplasms: phenotypic, molecular and functional characterization.** 2019. 167f. Thesis (Doctorate). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and myelofibrosis (PMF) are myeloproliferative neoplasms (MPN) characterized by an increased proliferation of mature myeloid cells and their precursors in the bone marrow and peripheral blood. The MPN's pathophysiology is associated with the presence of at least one of the driver mutations JAK2, CALR and MPL, and also with epigenetic deregulation and alterations in the bone marrow hematopoietic niche. Multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) are an essential element for the maintenance and development of the hematopoietic niche and they secrete a large number of immunomodulatory molecules, pro-angiogenic and growth factors. The aims of this study were to characterize MSC from PV, ET and PMF patients, focusing on their phenotypic, molecular and functional properties and to determine the cytokines and chemokines profile of hematopoietic niche. The results indicated that MSC from MPN patients are similar to MSC from healthy individuals in regard to their immunophenotypic profile and multipotentiality. However, MSC from MPN patients are hard to establish in vitro and expand slower than normal MSC. MSC from PV patients are more resistant to cell death, they show an increased expression of the antiapoptotic gene BIRC2 and less immunomodulatory properties in comparison to normal MSC. In NMP, the hematopoietic niche presented an oncoinflammatory profile characterized by elevated levels of inflammatory cytokines, chemokines and proangiogenic factors in comparison to the normal hematopoietic niche, mainly in PV patients. Taken together, our results indicate the deregulation of the hematopoietic niche in MPN. These alterations have potential to interfere in hematopoiesis, neoangiogenesis, cell-cell interactions and cell-stroma interactions in the bone marrow from MPN patients contributing to a pro-tumoral microenvironment and disease pathogenesis.

Keywords: Myeloproliferative neoplasms; multipotent mesenchymal stromal cells; oncoinflammation; neoangiogenesis; apoptosis; hematopoietic niche.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracterização imunofenotípica das MSC de controles e pacientes quanto aos antígenos CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD49e e CD166. MSC dos grupos CTRL (n=5), PV (n=7), TE (n=4) e MF (n=2). Resultados foram expressos em percentual de células positivas, e as barras horizontais indicam medianas e range dos Figura 2. Caracterização imunofenotípica dos antígenos de superfície CD54, HLA-DR, CD106, CD51/61, CD34, CD31, CD14 e CD45. MSC dos grupos CTRL (n=5), PV (n=7), TE (n=4) e MF (n=2). Resultados foram expressos em percentual de células positivas, e as barras horizontais indicam as medianas e range dos 10.000 eventos Figura 3. Diferenciação das MSC (A) dos grupos CTRL, PV, TE e MF em adipócitos (coloração de Sudam III; B) e osteócitos (coloração von kossa; C). Imagens no aumento 20 x, no microscópio de fase invertida Olympus DP71......50 Figura 4. Perfil de cinética de crescimento das MSC dos grupos PV (n=3), TE (n=3), MF (n=1) e CTRL (n=4). A curva exponencial de crescimento foi gerada utilizando o software Prisma 6.0 (GraphPad). Teste estatístico de Mann-Whitney. Os valores plotados correspondem às médias e desvios padrão das contagens realizadas em Figura 5. Tempo de duplicação (DT) das MSC pertencente aos grupos PV (n=3), TE (n=3, JAK2), MF (n=1, JAK2) e CTRL (n=4). Teste estatístico de Mann-Whitney.... 52 Figura 6. Resultados da comparação do percentual de proliferação de células T CD4+ e CD8+ alogênicas cocultivadas com MSC de pacientes com PV (n=5) e doadores saudáveis (CTRL, n=3). Ensaios realizados em triplicata. Teste estatístico de Mann-Figura 7. Comparação entre as porcentagens da proliferação de células T CD4⁺ alogênicos cocultivados com MSC dos grupos PV (n=5) e CTRL (n=3). Ensaios realizados em triplicata Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes quando Figura 8. Comparação entre as porcentagens da proliferação de células T CD8⁺ alogênicos cocultivados com MSC dos grupos PV (n=5) e CTRL (n=3). Ensaios realizados em triplicata. Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes guando **Figura 10.** Comparação entre as porcentagens da proliferação de células T CD8⁺ alogênicos cocultivados com MSC dos grupos PV (n=5) e CTRL (n=3). Teste de Mann-Whitney. Não houve diferença da percentagem de inibição das células T CD8⁺ entre os grupos analisados. Ensaios realizados em triplicata. Resultados significantes quando p<0,05

Figura 16. Rede das interações entre as citocinas, quimiocinas e fatores proangiogênicos da medula óssea do grupo controle (CTRL). As correlações foram calculadas pelo teste de Spearman, e a força da correlação determinada pelo valor de r. O grupo controle apresentou muitas correlações moderadas (linhas finas; 0,36 ≥ r ≤ 0,67) e algumas fortes (linhas grossas, r≥ 0,68). A quimiocina CCL2 não exibiu correlação com os demais analitos (destaque em vermelho)......69 Figura 17. Rede das interações entre as citocinas, quimiocinas e fatores proangiogênicos da medula óssea do grupo de policitemia vera (PV). As correlações foram calculadas pelo teste de Spearman, e a força da correlação determinadas pelo valor de r. O grupo policitemia vera apresentou muitas correlações moderadas (linhas finas; $0,36 \ge r \le 0,67$) e algumas fortes (linhas grossas, $r \ge 0,68$)......70 Figura 18. Rede das interações entre as citocinas, quimiocinas e fatores proangiogênicos da medula óssea do grupo de pacientes com trombocitemia essencial (TE). As correlações foram calculadas pelo teste de Spearman, e a força da correlação determinadas pelo valor de r. O grupo trombocitemia essencial apresentou muitas correlações moderadas (linhas finas; $0,36 \ge r \le 0,67$) e fortes (linhas grossas, $r \ge 0,68$), e uma negativa (linha tracejada, r<0). HGF e VEGFR2 não exibiram correlação com os demais analitos analisados (destague em vermelho)......72

Figura 21. Análise de categorização das citocinas, quimiocinas e fatores próangiogênicas do plasma de medula óssea do grupo PV. Quadros em preto representam alto produtores para o analito e os branco os baixos produtores. Cada coluna representa um analito diferente, e cada linha representa os padrões de Figura 25. Quantificação de genes regulatórios da apoptose em MSC de pacientes PV (n=6), TE (n=6) e MF (n=3), e indivíduos saudáveis (CTRL, n=5), por SYBR® Green. Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Endógenos utilizados foram ACTB e B2M. Teste de Mann-Whitney......79 Figura 26. Quantificação de apoptomiRs em MSC de pacientes PV (n=7), TE (n=7) e MF (n=3), e indivíduos saudáveis (CTRL, n=5), por SYBR® Green. Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Endógenos utilizados foram RNU24 e RNU48. Teste de Mann-Whitney.....81 Figura 27. Quantificação de genes relacionados com inflamação e angiogênese em MSC de pacientes PV (n=8) e indivíduos saudáveis (CTRL, n=5), por TaqMan[®]. Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Endógeno Figura 28. Resultado das análises de correlação entre a expressão do MIR15A com os genes preditos BCL2 e IL6, nos grupos de pacientes com PV e doadores saudáveis (CTRL). Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Teste de correlação de Spearman......85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados laboratoriais, epidemiológicos e estratificação de risco em pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária......6 Tabela 2. Características demográficas e diagnóstico das amostras de aspirados de medula óssea de pacientes com suspeita de Neoplasias mieloproliferativas e doadores de medula óssea (controles) obtidas durante o estudo......27 Tabela 3. Anticorpos (BD Biosciences) utilizados para a caracterização dos antígenos Tabela 4. Sondas utilizadas nos ensaios TaqMan para quantificação de expressão gênica em MSC e vesículas extracelulares de MSC.....41 Tabela 5. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de expressão gênica em MSC, cujo método aplicado foi o SYBR Green......42 Tabela 6. Referência das sondas utilizados nos ensaios TaqMan na quantificação da expressão de microRNAs......43 Tabela 7. Resultados da eficiência do isolamento das MSC entre os grupos CTRL, PV, TE e MF......48 Tabela 8. Resultados das análises da expressão dos marcadores de superfície CD90, CD105, CD73, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD166 e CD54 das MSC de pacientes com NMP e grupo CTRL......48 Tabela 9. Resultados das análises comparativas dos tempos de duplicação (DT) de MSC dos grupos PV (n=3), TE (n=3) e CTRL (n=4). Teste de Mann-Whitney......52 Tabela 10. Percentual de proliferação das células mononucleares alogênicas cocultivadas com MSC dos grupos CTRL (n=3) e PV (n=5)......58 Tabela 11. Quantificação do percentual de inibição de proliferação de células mononucleares alogênicos cocultivados com MSC dos grupos CTRL (n=3) e PV (n=5)......59 Tabela 12. Resultados do percentual de viabilidade celular de MSC de CTRL (n=3) e ΡV (n=3), após tratamento por 24h com diferentes concentrações de estaurosporina......63 Tabela 13. Resultados da quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores próangiogênicos no plasma de MO de doadores saudáveis (CTRL; n=17) e pacientes com PV (n=19), TE (n=19) e MF (n=16).....64

Tabela 14. Valores das medianas e do p obtido nas análises comparativas dos níveis
de expressão de genes relacionados a regulação da apoptose em MSC de PV, TE,
MF e CTRL80
Tabela 15. Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão de
apoptomiRs em MSC de PV, TE, MF e CTRL81
Tabela 15. Resultados da análise de predição utilizando a base de dados miRWalk2.0.
Interações de microRNAs-gene alvo83
Tabela 16. Comparação dos níveis dos genes relacionados com a inflamação e
angiogênese em pacientes PV (n=8) e CTRL (n=5)84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta actina
AIF	Apoptosis inducing fator
ALCAM-1	Molécula de adesão celular ativadora de leucócitos
AKT	AKT serine/theonine kinase 1
ALPHA-MEM	Minimum essential medium alpha
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ApoptomiRs	MicroRNAs envolvidos com a apoptose
ASXL1	Additional sex combs-like 1
ATP	Trifosfato de adenosina
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAK	BCL2-antagonist/killer
BAX	BCL-2 associated X protein
BCL2	BCL2 apoptosis regulator
BCL2A1	BCL2 related protein A1, conhecido também como BFL-1
BCL2L1	BCL2-like 1, conhecido também como BCL-xL
BCL2L2	BCL2 like 2, conhecido também como BCL-W
BCR/ABL1	Oncogene de fusão
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BIK	BCL2 interacting killer
BIM	BCL2 like protein 11
BIRC	Baculoviral IAP repeat containing
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
B2M	Beta 2 microglobulina
CALR	Calreticulina
CBL	CBL proto-oncogene
CCL	C-C motif chemokine
CD	Cluster of differentiation
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em pesquisa
CFLAR	CASP8 and FADD like apoptosis regulator, conhecido como c-FLIP
CFSE	Carboxylfluorescein succinimidyl ester

CO ₂	Dióxido de Carbono		
СТ	Cycle threshold		
СТН	Célula-tronco hematopoética		
CTRL	Controles		
CXCL	C-X-C motif chemokine ligant		
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor		
CYTC	Citocromo c		
dATP	Deoxiadenosinas trifosfatos		
DD	Domínio de morte		
DIABLO	DIABLO IAP-binding mitochondrial protein		
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System		
DISC	Death-inducing signaling complex		
DMSO	Dimetilsufóxido		
DNA	Ácido desoxirribonucleioco		
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 alpha		
Dr(a)	Doutor(a)		
DT	Tempo de duplicação		
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid		
ENDOG	Endonuclease G		
EPO	Eritropoetina		
ERK	Extracellular signal-regulated kinases		
ETV	Episódios de tromboembolismo		
EZH2	Enhancer of zeste homologue 2		
FADD	Fas associated via death domain		
FASL	Ligante Fas		
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto		
FGF	Fator de crescimento fibroblasto		
FITC	Fluorescein isothiocuanate		
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto		
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosfate Dehydrogenase		
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas		
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos		
HC	Hospital das clínicas		
HGF	Fator de crescimento de hepatócito		

HIF-1α	Fator induzível de hipóxia-1α		
HLA	Antígeno leucocitário humano		
HSP90	Proteína de shock térmico de 90kDa		
HU	Hidroxicarbamida (hidroxiuréia)		
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1		
IDH	Isocitrato desidrogenase		
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase		
IFN	Interferon		
IFN-γ	Interferon gamma		
IGF	Insulin-like growth factor		
IL	Interleucinas		
IL1RA	Receptor agonista de interleucina 1		
IL6RA	Receptor de interleucina 6		
IPSS	International Prognostic Scoring System		
ISCT	International Society for Cellular Therapy		
JAK2	Janus quinase 2		
JAK2V617F	Mutação no gene JAK2 éxon 14		
LDH	Lactato desidrogenase		
LIF	Fator inibidor de leucemia		
LMA	Leucemia mieloide aguda		
LMC	Leucemia mieloide crônica		
LLC	Leucemia linfocítica crônica		
MAPK	Mitogen activated kinase-like protein		
MCL1	MCL1 apoptosis regulator		
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos		
MF	Mielofibrose primária		
MM	Mieloma múltiplo		
MSC	Células estromais mesenquimais multipotentes		
MO	Medula óssea		
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization		
MPL	MPL proto-oncogene, receptor de trombopoetina		
MPLW515	Mutação no gene MPL, substituição triptofano>alanina		
MPLW515K	Mutação no gene MPL, substituição triptofano>lisina		
MPLW515L	Mutação no gene MPL, substituição triptofano>leucina		

MPLW515R	Mutação no gene MPL, substituição triptofano>arginina		
mRNA	RNA mensageiro		
MV	Microvesículas		
NMP	Neoplasias mieloproliferativas		
OMS	Organização Mundial de Saúde		
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase		
PBMCs	Células mononucleares isoladas do sangue periférico		
PBS	Phosphate buffered saline		
PCR	Polymerase chain reaction		
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas		
PGE ₂	Prostaglandina E ₂		
Ph	Philadelphia, cromossomo resultante da translocação t(9;22)		
PI3	Peptidase inhibitor 3		
PIC	Protease inhibitory cocktail		
PV	Policitemia vera		
RIPK1	Receptor interacting serine/threonine kinase 1		
RNA	Ácido ribonucleico		
ROS	Espécies reativas de oxigênio		
ROX	Ribossomal oxygenase		
SBF	Soro fetal bovino		
SCF	Stem Cell factor		
SH2B3	SH2B adaptor protein 3		
SMD	Síndrome mielodisplásica		
SP	Sangue periférico		
SRSF2	Serine and arginine rich splicing factor 2		
STAT	Transducer and activator of transcription		
TE	Trombocitemia essencial		
TET2	Ten eleven translocation		
TGFB1	Transforming growth factor beta 1		
TNFR1	TNF Receptor superfamily member 1A		
TNFRSF10A	TNF receptor superfamily member 10a		
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa		
TPO	Trombopoetina		
TP53	Proteína tumoral p53		

TRADD	TNFRSF1A associated via death domain
TSP1	Trombospondina 1
UA	Unidades de absorbância
URE	Unidades de expressão relativa
USP	Universidade de São Paulo
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular 1
VE	Vesículas extracelulares
VEGF	Fator de crescimento vascular e endotelial
VEGFA	Fator de crescimento vascular e endotelial A
VEGFR2	Receptor para fator de crescimento vascular endotelial 2

LISTAS DE SÍMBOLOS

- + positivo
- µ micro
- α alfa
- β beta
- γ gama
- ± mais ou menos
- ≥ maior ou igual
- ≤ menor ou igual
- Δ delta
- ® registrado
- ™ marca registrada, do inglês *trade mark*

SUMÁRIO

RESUMO ABSTRACT Lista de figuras Lista de tabelas Lista de abreviaturas e siglas Lista de símbolos	i ii viii x xix
1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Neoplasias Mieloproliferativas: Classificação, Diagnóstico e Tratamento	2
1.2 Fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas	7
1.2.1 Mutações iniciadoras (<i>Driver</i>) e marcadores clonais	7
1.3 Oncoinflamação, alterações do processo de apoptose, neoangiogênese e microambiente medular em NMP	11
1.3.1 Alterações da Apoptose	11
1.3.2 Oncoinflamação	13
1.3.3 Neoangiogênese	15
1.3.4 Microambiente medular e a célula estromal mesenquimal	17
1.3.4.1 Sinalização celular por vesículas extracelulares	20
2. OBJETIVOS	24
2.1 Estratégias adotadas para o alcance dos objetivos	25
3. CASUÍSTICA	26
3.1 Amostras de aspirado de medula óssea	27
3.2 Amostras de plasma de medula óssea	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Colheita de amostras de medula óssea	31
4.2 Colheita de amostras de sangue periférico	31
4.3 Isolamento do plasma das amostras de sangue periférico e medula óssea	31
4.4 Isolamento e cultivo de MSC	31
4.5 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico	33
4.6 Ensaio de diferenciação da MSC em adipócitos e osteócitos	33
4.7 Caracterização imunofenotípica das MSC	34
4.8 Ensaio de cocultivo de células mononucleares e MSC: Detecção do poten imunossupressor das MSC	cial 35
4.9 Cálculo do tempo de duplicação (doubling time) do número de células MS	C .37

4.10 Determinação da sensibilidade das MSC à estaurosporina	
4.11 Isolamento de vesículas extracelulares derivadas de MSC	
4.12 Caracterização de vesículas extracelulares derivadas de MSC quanto tamanho e concentração	ao 40
4.13 Extração de RNA de MSC	40
4.14 Extração de RNA de vesículas extracelulares de MSC	41
4.15 Síntese de cDNA e quantificação de genes por PCR em tempo real	41
4.16 Síntese de cDNA e quantificação de microRNAs por PCR em tempo r MSC e de vesículas extracelulares derivadas de MSC	eal de 43
4.17 Ensaio multiplex para quantificação de citocinas, quimiocinas e fato	ores pró-
angiogênicos	
4.18 Análises dos prontuários de pacientes com NMP	45
4.19 Análise Estatística	45
5. RESULTADOS	
5.1 Caracterização de MSC isoladas de pacientes com NMP e CTRL	47
5.2 Cinética de crescimento e perfil de crescimento de MSC	52
5.3 Imunomodulação das células mononucleares de indivíduos saudáveis MSC de pacientes com PV	pelas 54
5.4 Sensibilidade à estaurosporina	62
5.5 Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores pró-angiogênicos no	o plasma
de medula óssea de pacientes com PV, TE e MF, e indivíduos do grupo CTR	L64
5.6 Expressão de genes e microRNAs em MSC	79
5.7 Caracterização de vesículas extracelulares derivadas de MSC de pacier	ntes com
PV e de doadores saudáveis (CTRL)	92
6. DISCUSSÃO	95
7. CONCLUSÃO	108
8. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS	110
9. APÊNDICES	123
10. ANEXOS	

1. Introdução

1.1 Neoplasias mieloproliferativas: Classificação, Diagnóstico e Tratamento

Em 1951, em editorial publicado na revista *Blood,* o hematologista americano William Dameshek definiu, pela primeira vez, o conceito das Neoplasias Mieloproliferativas (NMP), agrupando diversas desordens hematológicas caracterizadas pela proliferação exacerbada de precursores mieloides na medula óssea (MO), acompanhada da elevação de células sanguíneas com maturação preservada no sangue periférico (SP) (DAMESHEK, 1951).

Dentre essas doenças, inicialmente agrupadas por Dameshek, estavam a leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MF). Além destas, segundo a última classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 2016, são consideradas NMP a leucemia neutrofílica crônica, leucemia eosinofílica crônica não especificada e a NMP inclassificável (ARBER et al., 2016).

As NMP podem ser divididas conforme a presença do cromossomo Philadelphia (Ph), alteração citogenética resultante da translocação t(9;22) (q34;q11), que ocasiona o aparecimento do oncogene *BCR/ABL1*. Assim sendo, as NMP seriam divididas em LMC, uma NMP Philadelphia positiva ou *BCR/ABL1*⁺, e as demais NMP Philadelphia negativas ou BCR/ABL1⁻ (RUMI; CAZZOLA, 2017).

O presente estudo tem como foco a fisiopatologia de pacientes com PV, TE e a MF, conhecidas como NMP Philadelphia negativas clássicas, em virtude da sobreposição de algumas características comuns (RUMI; CAZZOLA, 2017).

A policitemia vera é a mais comum das três doenças categorizadas como NMP Philadelphia negativo clássicas. Sua principal característica é a expansão clonal do progenitor eritroide, e que pode ou não estar acompanhada de leucocitose e/ou trombocitose (TEFFERI; BARBUI, 2017). Seu diagnóstico baseia-se na avaliação de três critérios: (i) aumento da massa eritrocitária (hemoglobina >16,5g/dL para homens e >16g/dL para mulheres; OU hematócrito >49% em homens e >48% em mulheres; OU contagem de eritrócitos >25% do valor de referência); (ii) analise da biópsia de MO constatando-se hipercelularidade panmielocítica para idade; (iii) presença da mutação no gene *JAK2* (exon 14 ou 12). Na ausência de um dos critérios citados, a constatação de eritropoetina em níveis subnormais no soro substitui um dos critérios e permite a confirmação do diagnóstico (ARBER et al., 2016). A trombocitemia essencial (TE) caracteriza-se por alterações das células da série megacariocítica (SH SWERDLOW; CAMPO; HARRIS, 2008). Para o diagnóstico da TE são necessários que o paciente atenda critérios os maiores: (i) contagem plaquetária ≥450.000x10⁹/L; (ii) biópsia de MO mostrando proliferação especialmente da linhagem megacariocítica com aumento de megacariócitos maduros e com núcleo hiperlobulado, sem desvio à esquerda de neutrófilos, fibras de reticulina com grau I; (iii) exclusão do diagnóstico de LMC, síndrome mielodisplásica (SMD) e outras neoplasias mieloides; (iv) presença da mutação JAK2V617F, CALR ou MPL. Na ausência de um dos critérios maiores, o diagnóstico pode ser confirmado pela constatação da presença de um marcador clonal ou exclusão de trombocitose reativa (ARBER et al., 2016).

A mielofibrose primária caracteriza-se pela expansão clonal de granulócitos e megacariócitos. Em sua fase inicial pode ser observada a deposição de reticulina na MO, contudo com a progressão da doença para a fase fibrótica, haverá fibrose progressiva, com deposição de colágeno e fibras de reticulina (TEFFERI, 2018).

O diagnóstico da MF é mais complexo do que o da PV e TE, e a organização mundial da saúde (OMS) recomenda critérios específicos para as fases diferentes da doença. O diagnóstico da MF em fase celular, ou pré-fibrótica baseia-se na presença de três critérios: (i) MO apresentando proliferação com atipias de megacariócitos, fibras de reticulina grau I, sangue periférico com hipercelularidade, proliferação granulocítica e a diminuição ou não da eritropoese; (ii) exclusão do diagnóstico para LMC, PV, ET, síndrome mielodisplásica e outras neoplasias mieloides; (iii) presença da mutação JAK2V617F, CALR, MPL ou outro marcador clonal, e ausência de fibrose reativa de reticulina na MO. Na ausência de algum desses critérios o diagnóstico desse ser baseado na presença de anemia, e/ou leucocitose acima de 11.000x10⁹/L, e/ou esplenomegalia palpável, e/ou lactato desidrogenase (LDH) aumentada substitui um dos critérios chaves e fecha o diagnóstico para MF fase celular (ARBER et al., 2016).

No diagnóstico de MF em fase fibrótica, leva-se em consideração os mesmos critérios para a fase celular, contudo com as seguintes modificações nos critérios: (i) MO apresentando fibras de reticulina e/ou colágeno grau 2 ou 3; (ii) exclusão de mielofibrose reativa. Na ausência de um dos critérios, a presença de anemia, e/ou leucocitose acima de 11.000x10⁹/L, e/ou esplenomegalia palpável, e/ou LDH aumentada, e/ou leucoeritroblastose, substitui um dos critérios essenciais e confirma o diagnóstico de MF fase celular (ARBER et al., 2016).

O prognóstico da MF é o pior dentre as três NMP, e requer a utilização de um ou mais sistemas de pontuação prognóstica, como no IPSS (do inglês, *International Prognostic Scoring System*), o DIPSS e DIPSS-Plus (do inglês, *Dynamic International Prognostic Scoring System*). Esses sistemas de pontuação levam em consideração a presença de fatores como idade, concentração de hemoglobina, contagem de elementos celulares (plaquetas, leucócitos e blastos), necessidade transfusional, cariótipo desfavorável e sintomas constitucionais (perda de peso, febre, dispneia e cansaço). O risco (escore) é dependente do número de fatores adversos apresentado pelo paciente, quanto menor a presença desses fatores menor é o risco estabelecido e melhor o prognostico (maior tempo entre diagnostico e a progressão da doença). A sobrevida desses pacientes pode variar muito, mas pacientes com prognóstico ruim e alto risco a pior sobrevida, de 1,3 a 2,3 anos. Contudo, os pacientes com menor risco e melhor prognóstico apresentam sobrevida estimada de 11,3 a 15 anos (TEFFERI, 2018).

Em resumo, o diagnóstico diferencial das NMP baseia-se na análise conjunta das alterações moleculares, dos achados histológicos da biópsia da medula óssea (MO) e valores de parâmetros hematológicos do SP (TEFFERI, 2018; TEFFERI; BARBUI, 2017).

Na tabela 1, estão descritas as principais características, dados epidemiológicos e estratificação de risco da PV, TE e MF.

As terapias medicamentosas utilizadas, atualmente, para o tratamento das NMP são paliativas, não impedem a progressão da doença, tampouco, promovem o aumento de sobrevida. Contudo, conseguem as medidas paliativas atuam nas complicações secundárias, prevenindo eventos tromboembólicos e proporcionando melhora de sintomas constitucionais (febre, prurido, fraqueza e dores de cabeça) e da qualidade de vida desses pacientes, principalmente daqueles com PV e TE (TEFFERI, 2016).

O tratamento para PV, TE e MF pode envolver a utilização do citorredutor hidroxicarbamida (hidroxiuréia, HU), imunomoduladores como o INF- α (interferon- α) a talidomida, os agentes bloqueadores de citocinas (antagonistas de IL-5 e IL-6) e os inibidores de tirosina quinase JAK2 (TEFFERI, 2016).

O ruxolitinibe, inibidor da tirosina quinase JAK2, foi aprovado em 2011 para pacientes com MF não responsivos ou intolerantes a HU. Hoje, é também recomendado como o tratamento de segunda linha para pacientes com PV (VERSTOVSEK et al., 2016). Esse inibidor seletivo de JAK2 e JAK1 impede a fosforilação de STA3 ao competir com a ligação de ATP no sítio catalítico das JAK. Este medicamento foi capaz de promover a redução da esplenomegalia, a melhora dos sintomas e sobrevida, inclusive em pacientes negativos para a mutação (DEISSEROTH et al., 2012; HARRISON et al., 2017; MASCARENHAS; MUGHAL; VERSTOVSEK, 2012), mudanças significativas no grau de fibrose medular e a redução da carga alélica para pacientes JAK2V617F positivos (KVASNICKA et al., 2018; VANNUCCHI et al., 2017).

O transplante alogênico de medula óssea é a única modalidade terapêutica curativa disponível para as NMP. Realizado em pacientes com MF, esse procedimento apresenta acessibilidade limitada, pois poucos pacientes são elegíveis visto que a maioria apresenta idade avançada (acima de 60 anos), possuem comorbidades, além da dificuldade de se selecionar doadores HLA compatíveis (BALLEN et al., 2010; TEFFERI, 2016).

Pelo exposto, há a necessidade de pesquisas que busquem terapias mais efetivas, específicas, ou mesmo curativas para o paciente ou que sejam capazes alterem o curso da doença, impedindo as progressões para MF e/ou LMA (leucemia mieloide aguda)

Tabela 1. Dados laboratoriais, epidemiológicos e estratificação de risco em pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária.

Doença	Características principais	Epidemiologia	Estratificação de riscos
Policitemia vera (PV)	 ✓ Eritrocitose acentuada, com ou sem leucocitose e/ou trombocitose ✓ JAK2+ ✓ MO com hipercelularidade panmielocítica ✓ Eritropoetina sérica subnormal 	 ✓ Maiores de 60 anos ✓ Prevalência maior em mulheres ✓ Estimativa de vida: 14 anos ✓ Incidência: 0,68- 2,6/100.000/ano ✓ 5% progressão para LMA ✓ 30% progressão para MF 	BAIXO ✓ Idade<60 anos ✓ Sem histórico de ETV (episódios de tromboembolismo venoso) ALTO ✓ Idade>60 anos ✓ Histórico de ETV
Trombocitemia essencial (TE)	 ✓ Trombocitose acentuada com eritropoese e granulopoese normais ✓ MO com megacariocitose, fibras de reticulina grau I ✓ JAK2V617F+, ou CALR+ ou MPL+ 	 ✓ Maiores de 60 anos ✓ Prevalência maior em mulheres ✓ Estimativa de vida: 20 anos ✓ Incidência: 0,38-1,7/100.000/ano ✓ 10-20% progressão para LMA ✓ 30% progressão para MF 	MUITO BAIXO ✓ Idade ≤ 60 anos ✓ Sem histórico de ETV ✓ Ausência JAK2/MPL BAIXO ✓ Idade ≤ 60 anos ✓ Sem histórico de ETV ✓ JAK2/MPL positivo INTERMEDIÁRIO ✓ Idade >60 anos ✓ Sem histórico de ETV ✓ Ausência JAK2/MPL ALTO RISCO ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Sem histórico de ETV ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos ✓ Idade >60 anos
Mielofibrose primária (MF)	 ✓ Trombocitose e granulocitose, com ou sem eritropenia; OU anemia e/ou leucocitose ✓ MO com megacariocitose, fibras reticulina grau 1; OU hipocelularidade, fibras de reticulina e/ou colágeno grau 3 ✓ JAK2V617F+, ou CALR+ ou MPL+ ✓ Esplenomegalia e leucoeritroblastose 	 ✓ Maiores de 66 anos ✓ Prevalência igual entre homens e mulheres ✓ Estimativa de vida: de 2-11 anos ✓ Incidência: 0,1-1/100.000/ano ✓ 10% progressão para LMA 	✓ JAK2/MPL mutados Variável – depende do score atingido pelo sistema de pontuação de prognóstica adotado

1.2 Fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas

As NMP Ph⁻ compartilham diversas características relacionadas a fisiopatologia, sendo a principal o acometimento clonal da célula tronco hematopoética (CTH) e seus progenitores, principalmente os progenitores mieloides, o que resulta em uma MO hipercelular e hipersensível à importantes fatores de crescimento regulatórios (SH SWERDLOW; CAMPO; HARRIS, 2008).

No sangue periférico (SP) observa-se o resultado da proliferação anormal medular com a elevação de um ou mais elementos da série mieloide, como plaquetas, neutrófilos e/ou eritrócitos, cujo desempenho de funções e diferenciação não foram afetados (SH SWERDLOW; CAMPO; HARRIS, 2008; TEFFERI; BARBUI, 2017).

A progressão das NMP envolve a fibrose medular, hematopoese extramedular e a transformação leucêmica, principalmente para leucemia mielóide aguda (LMA) (ARBER et al., 2016; SH SWERDLOW; CAMPO; HARRIS, 2008).

A fisiopatologia das NMP está associada a alterações moleculares e epigenéticas. As mutações iniciadores descritas estão presentes nos genes codificadores da tirosina quinase JAK2 (do inglês, *Janus kinase* 2, exons 12 e 14), receptor de trombopoetina (*MPL*) e calreticulina (*CALR*) (CAZZOLA; KRALOVICS, 2014; TEFFERI; PARDANANI, 2018).

1.2.1 Mutações iniciadoras (*Driver*) e marcadores clonais

A melhor compreensão da fisiopatologia das NMP foi obtida por meio da descoberta da contribuição das alterações moleculares adquiridas nas CTH, no começo da década passada. A descrição das alterações moleculares foi considerada o marco do entendimento da fisiopatologia das NMP e promoveu o aperfeiçoamento do diagnóstico e o desenvolvimento de novas terapias, como os inibidores de JAK (JAMES et al., 2006; NANGALIA; GREEN, 2017).

São consideradas alterações moleculares especificas das NMP: as mutações iniciadoras presentes nos genes da *JAK2*, *CALR* e *MPL*. A aquisição das mutações do tipo iniciadoras ou fundadoras dão origem ao clone alterado maligno, responsável pelo fenótipo mieloproliferativo da doença (CAZZOLA; KRALOVICS, 2014).

A mutação no gene *JAK*2, a primeira a ser descrita, conduz a codificação da enzima JAK2 com atividade quinase alterada, constitutiva, sem regulação.

A substituição de uma guanina por uma timina, na posição 1849 no éxon 14, resultando na troca do aminoácido valina pelo aminoácido fenilalanina no códon 617 (JAK2V617F), afeta o domínio pseudokinase JH2 da enzima. O domínio JH2 perde a função regulatória da atividade quinase da JAK2, o que conduz a atividade de quinase da JAK-2 constitutiva e a hiperresponsividade das células hematopoéticas à sinalização de citocinas pelas vias de sinalização STAT5, MAPK/ERK e PI3/AKT (KHWAJA, 2006; O'SHEA; GADINA; SCHREIBER, 2002).

A proteína JAK2 está associada (justaposta) as porções citoplasmáticas de receptores de citocinas e fatores de crescimento com função regulatória no processo de hematopoese, como a EPO (eritropoetina), TPO (trombopoetina) e G-CSF (fator estimulador de colônias granulocíticas) (JAMES et al., 2006; SILVENNOINEN; HUBBARD, 2015; VAINCHENKER et al., 2011).

Esta é a forma de mutação JAK2 a mais comumente encontrada, sendo observada em mais de 95% dos pacientes com PV, e de 50 a 60% nos pacientes com TE e MF (TEFFERI et al., 2014).

Na PV, aproximadamente 4% dos pacientes apresentam a mutação somática JAK2 localizada no éxon 12 (SCOTT et al., 2007; TEFFERI et al., 2014). Em casos ainda mais raros, outras formas diferentes de alterações moleculares no éxon 12, incluindo deleções e inserções, também foram identificadas em pacientes com PV (KILADJIAN et al., 2008; PIETRA et al., 2008). Os portadores da mutação da JAK2 no éxon 12 caracterizam-se por não exibirem trombocitose (KILPIVAARA; LEVINE, 2008).

A alta carga alélica da mutação JAK2V617F (mais de 50% dos alelos mutados) relaciona-se a maior esplenomegalia, presença de sintomas constitucionais, riscos de eventos trombóticos e progressão para MF (VANNUCCHI et al., 2008).

As mutações no éxon 9 do gene *CALR*, descobertas em 2013, geram alterações no domínio C-terminal da proteína. A CALR apresenta múltiplas propriedades, como chaperona, transacetilação, inibição da angiogênese, ligação e armazenagem de íons cálcio, no retículo endoplasmático (GUGLIELMELLI et al., 2014; HOUEN, 2019).

As mutações no gene *CALR* mais frequentes são as do tipo 1 (53% dos pacientes) e do tipo 2 (31,7% dos pacientes). A mutação de *CALR* tipo 1 resulta de uma deleção de 52 pares de bases e a do tipo 2 de uma inserção de 5 pares de bases no gene codificante (GUGLIELMELLI et al., 2014). Mais de 50 tipos diferentes de

mutações somáticas adquiridas no éxon 9 da CALR foram descritas, e todas são inserções ou deleções que resultam em na região C-terminal positivamente carregada, o que interfere na sua função como transportadora de cálcio e deixa a CALR fora do retículo endoplasmático, uma vez que o sinal de retenção da proteína é conferido pela região C-terminal negativamente carregada.

No citoplasma, a CALR mutante interage preferencialmente com o receptor MPL, ativando-o e por consequência desencadeia a via de sinalização MPL-JAK2, e a proliferação exacerbada de precursores e células mieloides (CAZZOLA; KRALOVICS, 2014; GUGLIELMELLI et al., 2014). Acredita-se ainda que exista uma forte relação entre a CALR mutante e o fenótipo de trombocitose, pois esta mutação parece afetar primariamente os megacariócitos, e isso pode ser detectado pelo fato desta mutação ainda não ter sido descrita na PV, NMP que pode cursar sem o acometimento megacariocítico (KLAMPFL et al., 2013).

Cerca de 30% dos pacientes com TE e MF negativos para JAK2V617F e MPL apresentam algum tipo de mutação no gene da *CALR*, sendo, portanto, a mutação CALR a segunda alteração molecular mais frequente nas NMP. Na MF, a presença da mutação CALR foi correlacionada a maior sobrevida dos pacientes quando comparada a pacientes com mutações JAK2 e MPL (KLAMPFL et al., 2013; TEFFERI et al., 2014).

A mutação iniciadora menos frequente nas NMP é a do gene *MPL*, responsável pela síntese de uma proteína chave para o crescimento e sobrevida dos megacariócitos. Descoberta em 2006, esta mutação acomete o éxon 10 e envolve principalmente o códon 515, no qual ocorre a substituição pontual de uma base nitrogenada, afetando assim o aminoácido codificado, substituindo um triptofano por uma leucina (MPLW515L), ou lisina (MPLW515K), ou arginina (MPLW515R), ou alanina (MPLW515A) (PIKMAN et al., 2006). A ausência do triptofano na posição 515 do receptor MPL faz com que ele se dimerize na ausência de citocinas ligantes, o que resulta em ganho de função, ativação espontânea e por consequência da via JAK-STAT, desencadeando a proliferação exacerbada de precursores mieloides (PIKMAN et al., 2006). Cerca de 3 a 4% de pacientes com TE e de 6 a 7% de pacientes com MF apresentam mutação no gene MPL (TEFFERI et al., 2014).

Pacientes portadores da mutação MPL exibem um quadro clínico mais grave quando comparado com os pacientes portadores da mutação JAK2V617F, tanto em TE quanto em MF, indicando que existem diferenças na sinalização JAK-STAT ativada
por cada mutação (KILPIVAARA; LEVINE, 2008). A alta carga alélica da mutação MPL foi associada ao desenvolvimento de mielofibrose e poderia explicar a progressão de TE para MF (KATO, 2015).

Aproximadamente 10 a 15% de pacientes com MF ou TE são chamados de triplos negativos, pois não apresentam positividade para as três mutações (JAK2, CALR e MPL) e possuem pior prognóstico quando comparados aos pacientes que apresentam as mutações JAK2, ou CALR ou MPL. A maior taxa de progressão para LMA foi associada a esse grupo de pacientes triplo negativos, bem como menor sobrevida na MF (TEFFERI; PARDANANI, 2018).

Existem ainda outras mutações somáticas adquiridas, não específicas às NMP, que são consideradas marcadores clonais e auxiliam no diagnóstico e interferem no prognóstico das NMP, principalmente na MF e na TE. Essas mutações ocorrem, em sua maioria, em genes que estão envolvidos na regulação da "maquinaria" epigenética, como o *TET2* (do inglês, *ten eleven translocation*), o *IDH* (isocitrato desidrogenase), o *ASXL1* (do inglês, *additional sex combs-like* 1), o *EZH2* (do inglês, *enhancer of zeste homologue 2*) e *DNMT3A* (do inglês, *DNA methyltransferase 3 alpha*). Mutações em genes de proteínas de vias de sinalização também foram descritas em NMP, é o caso dos genes *TP53* (do inglês, *tumor protein p53*), *SH2B3* (do inglês, SH2B *adaptor protein 3*), *SRSF2* (do inglês, *serine and arginine rich splicing fator 2*), CBL (CBL proto-oncogene) (TEFFERI, 2010).

Essas mutações adicionais contribuem para a progressão da doença e podem estar presentes antes mesmo do estabelecimento da NMP, ou são adquiridas após o estabelecimento da NMP, como resultado do processo de evolução subclonal da CTH maligna (TEFFERI, 2010; TEFFERI; VANNUCCHI, 2017).

Apesar do conhecimento sobre a fisiopatologia das NMP ter evoluído consideravelmente na última década, há ainda numerosos aspectos relacionados à fisiopatologia e progressão das NMP que não foram completamente elucidados.

Neste contexto, o presente estudo contribuiu descrevendo alterações do nicho hematopoético das NMP e a sua associação com os processos de inflamação e neoangiogênese.

1.3 Oncoinflamação, alterações do processo de apoptose, neoangiogênese e microambiente medular em NMP

1.3.1 Alterações da Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programada, decorrente de diferentes estímulos fisiológicos, patogênicos ou citotóxicos. A apoptose apresenta importante papel na embriogênese, manutenção da homeostase tecidual, envelhecimento celular e mecanismo inato supressor tumoral (GREEN; FITZGERALD, 2016).

Este mecanismo é regulado principalmente pelas vias de sinalização: extrínseca (via de receptores de morte celular) e intrínseca (via mitocondrial). O controle dessas vias proporciona tanto a ativação quanto o bloqueio do processo de apoptose.

A ativação da via extrínseca é induzida pela ligação dos receptores transmembrana específicos, conhecidos como receptores de morte (FAS, do inglês Fas cell surface death receptor, TNFR1, do inglês TNF receptor 1; DR4, do inglês death receptor 4; DR5, do inglês death receptor 5), com os seus agonistas específicos (FASL, Fas ligante; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; APO-2). As interações FAS/FASL, TNFR1-/TNF-α, DR4/APO-2 e DR5/APO-2 promovem o recrutamento de proteínas citoplasmáticas adaptadoras que se ligam ao domínio de morte (DD, do inglês death domain) presente no receptor. A proteína adaptadora FADD (do inglês Faz associated via death domain) liga-se ao receptor ativado FASL, DR4 ou DR5. O receptor TNFR1 ativado liga-se a proteína adaptadora TRADD (do inglês TNFRSF1A associated via death domain), que por sua vez recruta FADD e RIPK1 (do inglês receptor interacting serine/threonine kinase 1). O complexo molecular resultante, chamado de DISC (do inglês death-inducing signaling complex), forma-se e regula a ativação de caspase-8 ou caspase-10 (GALLUZZI et al., 2012). Caspase-8 ou -10 ativadas, promovem a ativação da caspase-3 e subsequentemente a ativação de outras proteases e nucleases responsáveis pelos eventos terminais da apoptose como a condensação da cromatina e fragmentação do DNA (KACZANOWSKI, 2016).

O DNA celular se fragmenta, a membrana conservada expõe fosfolípides que ocasionam a fagocitose por células vizinhas e degradação por enzimas lisossomais, impedindo, assim, a ativação do processo inflamatório (KACZANOWSKI, 2016).

A via intrínseca pode ser ativada por numerosos sinais de estresse intracelular, ou estímulos apoptogênicos, como danos no DNA, estresse oxidativo, quimioterápicos e a deficiência ou ausência de fatores de crescimento celulares (GALLUZZI et al., 2012). Esses estímulos agem na mitocôndria, o que promove a alteração da permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP, do inglês *mitochondrial outer membrane permeabilization*). Após estabelecimento do MOMP, são desencadeados uma série de eventos letais, como a perda do potencial de transmembrana, parada na síntese de ATP (trifosfato de adenosina) e a liberação de proteínas mitocondriais tóxicas no citoplasma (CYTC, citocromo C; AIF, do inglês *Apoptosis inducing fator*; ENDOG, endonuclease G; DIABLO, do inglês *DIABLO IAP-binding mitochondrial protein*) (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

O CYTC se une as proteínas APAF1 (do inglês *apoptotic peptidase activating fator 1*) e dATP (trifosfato de desoxiadenosina), formam o complexo chamado apoptossomo que desencadeará a apoptose por meio da ativação das caspase-9 e 3 (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

A ativação da apoptose por via independente de caspase (apoptose não clássica) também pode ocorrer, devido a inibição da cadeia respiratória, o que acarreta em aumento de espécies reativas de oxigênio e lesão irreversível da célula. Bem como, a ação das proteínas mitocôndrias AIF e ENDOG, que uma vez livres no citoplasma, migram para o núcleo celular provocando fragmentação do DNA (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

Assim, a ativação da via intrínseca apresenta múltiplos sinais de ativação, bem como múltiplos mecanismos executores, e tudo conecta-se ao mecanismo de controle mitocondrial (GALLUZZI et al., 2012).

Os mecanismos de apoptose nas mitocôndrias são finamente regulados por proteínas pertencentes a família BCL-2 (do inglês BCL2 *apoptosis regulator*). Suas funções primárias podem ser antiapoptóticas (BCL-2; BCL-X_L, do inglês *BCL2-like 1*; BCL-W, do inglês *BCL2-like 2*; BFL-1, do inglês *BCL2 related protein A1*; MCL-1, do inglês *MCL1 apoptosis regulator*), pró-apoptóticas formadoras de poro (BAX, do inglês BCL-2 *associated X protein*; e BAK, do inglês BCL2-*antagonist/killer*), e proteínas pró-apoptóticas do tipo BH3 (BAD, do inglês BCL2-*associated agonist of cell death*; BID, do inglês BH3 *interacting-domain death agonist*; BIK, do inglês BCL2 *interacting killer*; BIM, do inglês BCL2 *like protein 11;* e outras). BAK e BAX promovem abertura dos poros na membrana, o que inicia o MOMP. Quando ligados a membrana mitocondrial,

BIM e BAD aumentam a afinidade para a ligação de BAK e BAX à membrana. BCL-X_L, BCL-2 e MCL-1 apresentam função inibitória de BAK, BAX, BIM e BAD, por meio do sequestro mútuo. Assim, BCL2 e BCL-X_L inibem a liberação de CTYC no citoplasma. Por sua vez, BAD, BID, BAX e BIM promovem a liberação de CTYC (GALLUZZI et al., 2012; KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018).

A exacerbação ou o bloqueio da apoptose estão associados à patogênese de doenças autoimunes, neurológicas, cardiovasculares e em diferentes neoplasias (FAVALORO et al., 2012). Nas neoplasias hematológicas, a transformação maligna relaciona-se ao desequilíbrio da apoptose. A resistência ao processo de apoptose é frequentemente detectada em células dos pacientes com neoplasias, muitas vezes devido ao aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas (ZAMAN; WANG; GANDHI, 2014).

A alteração da apoptose nas NMP foi descrita por vários autores e pelo nosso grupo de pesquisa. Zhang *et al.* (2004) descreveram a desregulação da expressão de moléculas antiapoptóticas BCL-2 e BCL-X_L; e o de Zeuner *et al.* (2006) relataram o aumento da resistência das células à apoptose devido à elevação da expressão de *CFLAR* (do inglês *CASP8 and FADD like apoptosis regulator*) em precursores eritróides na PV (ZEUNER et al., 2006; ZHANG et al., 2004). Tognon e colaboradores (2012) reportaram o aumento da expressão de genes antiapoptóticos relacionados a via intrínseca de indução da apoptose, em TE e MF (TOGNON et al., 2012). Em estudo com células CD34⁺ e leucócitos de pacientes com PV, os autores observaram expressão aumentada de *A1*, *MCL1 e BID* e a diminuição de *BCL2* e *BCL2L1* (TOGNON et al., 2011). Todas estas alterações interferem no controle da apoptose e contribuem para a patogênese das NMP.

1.3.2 Oncoinflamação

Embora a relação entre neoplasias e o processo de inflamação tenha sido observado desde o começo do século 19, o reconhecimento da importância e do envolvimento do microambiente infamatório (oncoinflamação) na fisiopatologia e progressão das neoplasias é recente (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

As células tumorais são capazes de modular as células imunológicas visando a criação de um ambiente pró-tumoral. Neste ambiente, as células tumorais evadem da resposta imune. Tal modulação pode afetar os componentes efetores da resposta imune inata e adaptativa, por meio do aparecimento de células supressoras, células T reguladoras, citocinas e quimiocinas (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; RACHIDI et al., 2013).

A oncoinflamação relaciona-se à apoptose, devido a sinais de estresse genotóxicos que desencadeiam a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e também pela ação de algumas citocinas, como membros da família CXCL, que atuam em reguladores positivos da apoptose em células do sistema imune, um mecanismo para favorecer o escape da célula neoplásica a resposta imune antitumoral.

Da mesma forma, citocinas e quimiocinas secretadas por células do sistema imune ou mesmo pela célula neoplásica, como IL (interleucina)-6, IL-1 e TNF (fator de necrose tumoral), regulam as células endoteliais promovendo a angiogênese, um processo fundamental para garantir os suprimentos metabólicos (nutrientes e oxigênio), que necessários para manter o desenvolvimento e sobrevivência da célula neoplásica (NALDINI; CARRARO, 2005; RACHIDI et al., 2013).

A inflamação sustentada altera os sinais regulatórios presentes no microambiente medular, mediados por quimiocinas e citocinas, visando o favorecimento da célula neoplásica. As células de LMC seriam capazes de reduzir a sinalização de CXCL12-CXCR4 (do inglês *C-X-C motif chemokine ligant 12, C-X-C motif chemokine receptor 4*, respectivamente) um importante sinal regulatório para a CTH e a hematopoese, o que favoreceria a saída das células neoplásicas da medula óssea e o processo de leucemogênese (MUKAIDA; TANABE; BABA, 2017). A degradação da matriz extracelular e rearranjos na arquitetura medular são modificações também associadas ao processo inflamatório (TRIPODO et al., 2017).

Nas NMP foi descrita a relação entre a clonalidade celular, que desencadeia a neoplasia hematológica, com a inflamação crônica (LUSSANA; RAMBALDI, 2017). Acredita-se que o clone alterado da CTH seja o desencadeador da reação inflamatória, pela ativação constitutiva da via JAK/STAT nos pacientes e elevação da produção de citocinas inflamatórias (VAINCHENKER; CONSTANTINESCU, 2013). Da mesma forma, um estado inflamatório sustentado na medula óssea, anterior à neoplasia, que apresente um estresse oxidativo crônico com níveis elevados de ROS, criaria um microambiente de alto risco para o aparecimento de mutações, devido ao dano oxidativo persistente ao DNA das células hematopoéticas (HASSELBALCH, 2013).

As NMP são doenças que apresentam níveis alterados de citocinas e quimiocinas circulantes. Em pacientes com PV, TE e MF a fisiopatologia da doença foi associada a um perfil oncoinflamatório (CACEMIRO et al., 2018; POURCELOT et al., 2014; TEFFERI et al., 2011; VAIDYA et al., 2012). Além disso, as células neoplásicas e sua progênie parecem ser as responsáveis pela ativação indireta da secreção parácrina de citocinas inflamatórias por células normais do microambiente medular (LUSSANA; RAMBALDI, 2017).

Alguns estudos demonstraram ainda que os níveis de citocinas podem ter relevância no prognóstico das NMP. A elevação da IL-8 plasmática e/ou do receptor IL1RA (receptor agonista de interleucina 1) foi associada ao pior prognostico e diminuição da sobrevida em pacientes com MF (TEFFERI et al., 2011). Em pacientes com MF, o baixo nível da proteína C reativa (PCR) no plasma foi associado ao menor risco de progressão leucêmica (BARBUI et al., 2013). O aparecimento da fibrose e a sua intensificação, mediadas por citocinas inflamatórias, em pacientes com PV, TE e MF foram também correlacionados aos níveis de elevados das citocinas TGF-β1 (do inglês *transforming growth fator beta 1*), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), EGF (fator de crescimento de fibroblastos) e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) (BOCK et al., 2008; TEFFERI, 2005).

O entendimento do processo inflamatório e sua associação com o nicho hematopoético permitirá a melhor compreensão na patogênese e prognóstico nas NMP. Assim sendo, o presente trabalho descreveu as citocinas presentes no plasma da MO dos pacientes com PV, TE e MF.

1.3.3 Angiogênese

O crescimento de novos vasos sanguíneos derivados de uma vasculatura preexistente é definido com angiogênese. É um importante processo fisiológico orquestrado principalmente pelas células endoteliais. A hipóxia é um dos fatores desencadeantes do processo de angiogênese, a detecção de níveis de oxigênio leva a formação de novos vasos para suprirem as condições metabólica de células do parênquima tecidual. Assim, a angiogênese atuam na formação e regeneração de novos tecidos/órgãos, desde a nossa embriogênese (CARMELIET, 2005; LIEKENS; DE CLERCQ; NEYTS, 2001).

Sua regulação depende do equilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos. Entre os fatores pró-angiogênicos, destacamos: o VEGF, o PDGF, a angipoetina, o FGF e o HIF-1 α (fator induzível de hipóxia-1 α). Os fatores antiangiogênicos endógenos são a endostadina, a angiostatina e a TSP1 (trombospondina-1) (NISHIDA et al., 2006).

O desequilíbrio da angiogênese contribui para doenças inflamatórias, autoimunes, isquêmicas, infecciosas e também em processos neoplásicos (CARMELIET, 2005).

A angiogênese anormal foi descrita como um elemento fundamental no processo de tumorigênese, não sendo o iniciador e sim o promotor do desenvolvimento e progressão tumoral, por criar novos vasos que nutri as células neoplásicas e permite o descolamento dela para outros nichos (CARMELIET, 2005).

Nas neoplasias hematológicas as citocinas e quimiocinas fazem a ponte para a neoangiogênese. A indução de angiogênese, de forma direta ou indireta foi associada à IL-6, IL-1, IL-3, IL-4, CXCL8, TGF-β1, G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), GM-CSF (fator estimulador de crescimento de colônias granulócitos macrófagos) e HGF (fator de crescimento de hepatócito). Outras moléculas podem apresentar efeitos pró e antiangiogênicos dependendo do contexto, pois modulam as células endoteliais de forma direta ou indireta, como as quimiocinas da família CXC, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12. As interleucinas apresentam atividade antiangiogênica, por aturarem de foram direta célula neoplásica inibindo seu potencial angiogênico, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35 (COCCO et al., 2011).

O aumento da densidade de vasos e o aumento da expressão de VEGF na MO de pacientes com NMP e linfoma também foi descrito. Nos linfomas, esse aumento confere uma vantagem proliferativa para as células malignas, pela maior ativação das células endoteliais. Nas NMP, foi associados à fibrose e carga alélica da mutação JAK2V617F, o que poderia ser devido ao aumento da atividade de vias relacionadas a sinalização JAK2 (MEDINGER et al., 2009; TZANKOV et al., 2007).

As interações via receptores VEGFR, ativadas pela ligação com VEGF, estimulam a produção de HSP90 (proteína de *shock* térmico de 90kDa), que por sua vez aumenta a expressão de *BCL2*, promovendo a sobrevivência celular de células leucêmicas e células endoteliais (DIAS et al., 2002).

Níveis elevados de HGF foram observados no plasma de SP de pacientes com PV e MF, comparados ao grupo de indivíduos saudáveis, mas não apresentaram diferença na comparação entre as duas doenças. O aumento de HGF foi correlacionado com o fenótipo dessas doenças, sendo observado a correlação com a leucocitose e sintomas microvasculares (VAIDYA et al., 2012).

1.3.4 Microambiente medular e a célula estromal mesenquimal

A literatura destaca a participação do microambiente medular na fisiopatologia de neoplasias hematológicas, incluindo as NMP (HOERMANN; GREINER; VALENT, 2015; MEDYOUF, 2017). A célula tumoral não depende apenas da alteração intrínseca de suas propriedades (estabelecida pela presença das mutações condutoras), mas também do apoio e proteção das células vizinhas, para o desenvolvimento tumoral (KAUSHANSKY; ZHAN, 2019).

O microambiente medular (nicho hematopoético) é um espaço integrado, de complexa arquitetura, dinâmico e composto por uma população de células especializadas e matriz extracelular. Fazem parte do nicho hematopoético as CTH e seus progenitores, células estromais mesenquimais multipotentes (MSC), macrófagos, linfócitos, células endoteliais, adipócitos, osteoblastos e osteócitos. A sua organização, bem como a interação de seus elementos celulares geram as condições ideais para o desenvolvimento da CTH (GAO et al., 2018; MEDYOUF, 2017). As interações entre as CTH, as MSC e os osteoblastos protegem as CTH de estímulos para diferenciação e apoptose, mantendo um *pool* em quiescência e promovendo o potencial de autorenovação da CTH (WILSON; TRUMPP, 2006).

Descritas inicialmente em meados dos anos 60 e 70, as Células Estromais Mesenquimais Multipotentes (MSC) constituem uma população de células não hematopoéticas presentes na MO (FRIEDENSTEIN et al., 1968). Na MO são localizadas nas regiões centrais e no nicho perivascular ficando em contato com as CTH, com frequência estimada de cerca de 0,01% entre as células nucleadas residentes da MO. São também encontradas em outros tecidos biológicos, como polpa do dente, placenta, tecido sinovial, músculo esquelético e cordão umbilical (BANFI et al., 2000; YU et al., 2010).

As MSC possuem a capacidade de se diferenciar *in vivo*, quando em contato com os estímulos adequados, em linhagens de origem mesodérmicas, como os osteócitos, adipócitos e condrócitos (HORWITZ et al., 2005). Apresentam potencial de

diferenciação para todas as células que constituem o elemento funcional do microambiente hematopoético (SACCHETTI et al., 2007) e transdiferenciação em linhagens neuroectodérmicas e endodérmicas (PITTENGER et al., 1999).

As MSC secretam importantes fatores regulatórios relacionados a hematopoese, como IL-6, SCF (fator de célula-tronco; do inglês, *Stem Cell Factor*) e LIF (fator inibidor de leucemia; do inglês, *Leukemia inhibitory fator*). Por estas características e funções, são consideradas elementos fundamentais para a formação e manutenção do microambiente medular, o que tem relação direta com o suporte e a regulação da hematopoese (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, do inglês *International Society for Cellular Therapy*) estabeleceu os critérios mínimos para caracterização das MSC baseando-se em algumas propriedades: (i) capacidade de aderir ao plástico; (ii) multipotencial para diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos, *in vitro* sob condições específicas; (iii) expressão dos marcadores de superfície celular CD73, CD90 e CD105 e a ausência da expressão dos marcadores CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006).

A população de MSC pode exibir uma variação natural da expressão de marcadores de superfície celular, mesmo quando mantida *in vitro* com condições controladas (SAMSONRAJ et al., 2017). Por apresentar uma expressão de antígenos de superfície celular não específica e variável ao longo do tempo, a caracterização imunofenotípica é realizada utilizando não apenas os critérios definidos pela ISCT, mas também a adoção de outros marcadores de superfície celular específicos de outros tipos celulares. A escolha dessa marcação complementar é definida por cada grupo de pesquisa, levando em consideração suas particularidades e a necessidade demonstrar a pureza de seu *pool* de MSC e sítio de origem. Os marcadores negativos mais comumente adotados para MSC de MO são os presentes nas células endoteliais como o CD31, CD106, CD51 e CD61. Porém, marcadores positivos como CD146, CD44, CD49e, Nestina, são também utilizados na imunofenotipagem (SAMSONRAJ et al., 2017).

As MSC expressam grande número de moléculas bioativas: (i) como as moléculas de adesão, VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular 1), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), ALCAM (molécula de adesão celular ativadora de leucócitos); (ii) fatores de crescimento, como SCF, GM-SCF, HGF e EGF (Fator de crescimento epidermal); (iii) citocinas, como as interleucinas IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-7,

IL-8, IL-11, IL-14, IL-15; (iv) fatores angiogênicos, VEGF e PDGF; (v) moléculas imunomodulatórias, como PGE₂ (prostaglandina 2), HLA-G (antígeno leucocitário humano G) e IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase)(BOIRET et al., 2005; COLTER; SEKIYA; PROCKOP, 2001; DAZZI et al., 2006; GRONTHOS et al., 2001). Essas moléculas estão relacionadas com a modulação da resposta inflamatória, proliferação celular e efeitos citoprotetores (GNECCHI et al., 2008; WAN et al., 2008).

Outras funções biológicas podem ser atribuídas às MSC, como o seu efeito imunomodulador, muito explorado na terapia celular. A MSC apresenta capacidade de suprimir e controlar a resposta imune exacerbada, podendo inibir a proliferação de diversos tipos de células imunes, induzir a proliferação de linfócitos T e B regulatórios, e favorecer a maturação de células dendríticas (BERNARDO; FIBBE, 2013; JONES et al., 2007; KIM; KIM; CHO, 2013; NAUTA et al., 2006; TYNDALL; GRATWOHL, 2009).

Suas propriedades regenerativas como o efeito de *homing* para sítios que apresentam danos; secreção de fatores antifibróticos, anti-inflamatórios e angiogênicos; promoção da regeneração tecidual endógena e sua plasticidade em se diferenciar em diversos tipos celulares, são importantes e justificam sua utilização na terapia celular (BERNARDO; FIBBE, 2013; CAPLAN, 2017; CHEN; LI; CHEN, 2015; CHEN et al., 2008; MEIRELLES et al., 2009; ORLIC et al., 2003; SINGER; CAPLAN, 2011).

Infelizmente, as propriedades das MSC foram também associadas a efeitos deletérios. Efeitos estes ilustrados por sua participação no processo de tumorigênese em tumores sólidos, como adenocarcinomas, neuroblastomas, osteosarcomas, câncer de mama e neoplasias hematológicas (mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, LMA e NMP (MEDYOUF, 2017; NWABO KAMDJE et al., 2017; RAMAKRISHNAN; JOACHIM DEEG, 2009).

O envolvimento nos processos tumorais foi associado ao seu potencial de promover modificações do nicho hematopoético, favorecendo a proliferação e elevando a sobrevida da célula tumoral, resistência ao tratamento, progressão da doença (MEDYOUF, 2017; RAMAKRISHNAN; JOACHIM DEEG, 2009).

Em pacientes com TE, PV e MF, que apresentam a mutação JAK2V617F, as MSC apresentam baixo potencial de proliferação, senescência precoce, diminuição do potencial de diferenciação osteogênica, redução da capacidade de sustentar a hematopoese *in vitro* em longo prazo e alterações citogenéticas que apareceram tanto

em passagens iniciais quanto em avançadas (AVANZINI et al., 2014). Anomalias citogenéticas foram relatadas em MSC de pacientes com LMA, similares as que estão presentes nos blastos leucêmicos, contudo, a expressão de moléculas de adesão e antígenos de superfície celular não diferiu das MSC normais (HUANG et al., 2015).

As alterações do microambiente hematopoético, observadas nas NMP e em Leucemias, parecem ser resultantes da interação das células do estroma e hematopoéticas malignas. Durante esta interação, as células do estroma adquirem novas propriedades que favorecem a manutenção do clone anormal em detrimento da hematopoese normal (LATAILLADE et al., 2008).

O processo de transformação do microambiente medular normal em microambiente tumoral visa, portanto, a preservação e proteção da célula neoplásica. O microambiente tumoral age de maneira similar ao nicho hematopoético normal, regulando a migração, quiescência e autorenovação do clone alterado. Duas diferentes explicações são dadas para a transformação maligna do nicho: a primeira é que a transformação é coordenada pela célula neoplásica; a segunda é que as alterações no microambiente medular ocorrem antes do processo neoplásico, o que neoplásica favoreceria 0 aparecimento da célula (MEDYOUF, 2017: RAMAKRISHNAN; JOACHIM DEEG, 2009).

As observações da literatura sugerem que as MSC possuem uma mesma função pós-transformação maligna, sendo um importante elemento regulatório no microambiente medular, protegendo a célula tumoral devido sua propriedade inibitórias do sistema imune, mantendo um *pool* da célula tumoral em quiescência e longe de estímulos apoptóticos (o que correlaciona com resistência ao tratamento), secreção de biomoléculas que promovem a angiogênese direta e indiretamente via célula endotelial, como VEGF e IL-6 (MEDYOUF, 2017; RAMAKRISHNAN; JOACHIM DEEG, 2009).

De uma maneira geral, MSC são capazes de exercer sua atividade de modulação no microambiente medular via interações célula-célula, que podem ser autócrina, justácrina e parácrina. A sinalização parácrina inclui produtos como citocinas, complexos proteicos e vesículas extracelulares (KUSUMA et al., 2017).

1.3.4.1 Sinalização celular por Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares (VE) são partículas derivadas de membranas celulares com tamanhos variados (30-5000 nm) e classificadas com base na biogênese, tamanho e marcadores de membrana. Fazem parte desse grupo os exossomos e as microvesículas (MV). Exossomos são nanoestruturas (30-150 nm) que têm origem endocítica, enquanto MVs são vesículas, com um diâmetro entre 150 e 1000nm, derivadas diretamente da membrana celular por brotamento (REVENFELD et al., 2014). As VE apresentam a capacidade de alterarem o fenótipo de células vizinhas e são muito importantes nos processos de comunicação célula-célula. Dentro dessas vesículas pode-se encontrar microRNAs (miRNA), mRNA e proteínas. A interação dessas moléculas por uma célula pode resultar na alteração de seu fenótipo (QUESENBERRY et al., 2014).

Nosso estudo deu enfoque nos miRNAs, pequenos RNAs não-codificantes que inibem a expressão gênica pós-transcripcional por clivagem ou deadenilação. Essas moléculas exercem um importante papel na regulação da diferenciação celular, proliferação e apoptose (VECCHIONE; CROCE, 2010), eventos estes intimamente relacionados à fisiopatologia das NMP (Item 1.2). Denominam-se ApoptomiRs os miRNAs que estariam envolvidos na regulação da maquinária de apoptose (NUNES et al., 2013; STENVANG et al., 2012; TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013), atuando como programadores da morte celular, orquestrados pela família de proteínas BCL-2 e proteínas IAPs (DEJEAN et al., 2010). Pertubações na expressão de miRNAs estão fortemente associadas com a patogênese de diversas neoplasias humanas (VECCHIONE; CROCE, 2010). Um trabalho de nosso grupo demonstrou uma expressão anormal de miRNAs e genes envolvidos com a apotose em leucócitos do SP e células CD34⁺ da MO de pacientes com NMP estariam relacionados ao mieloacúmulo e compremetimento da apopotose (NUNES et al., 2013).

Estudos relatam que vesículas derivadas de MSC apresentam a capacidade de transferir RNA e assim revertem a lesão de tecidos renal e hepático, seja por estimularem a proliferação ou pela diminuição da apoptose (BRUNO et al., 2013; GATTI et al., 2011). Estudos *in vitro* em células epiteliais tubulares humanas tratadas com cisplatina, um agente neoplásico citotóxico, demonstraram que vesículas são capazes de regularem positivamente genes anti-apoptóticos como *BCL-X_L*, *BCL-2*, *BIRC8* e regularem negativamente genes que apresentam papel central na execução da apoptose celular, como *CASP1*, *CASP8* e *LTA* (BRUNO et al., 2009).

A reversão de fenótipos de câncer de linhagens de sarcoma, hepatoma e câncer de ovário foi associada com microvesículas derivadas de MSC da MO, a potencial propriedade antitumoral seria atribuída as MV-MSC pelo favorecerimento à apoptose e a inibição da progressão do ciclo celular das células tumorais (BRUNO et al., 2013). Contudo, os efeitos biológicos das vesículas extracelulares não apenas dependem do conteúdo, mas também do estado funcional e metabólico das células receptoras e das células que as originaram. Sendo assim, uma célula cancerígena pode eliminar vesículas extracelulares que induzem o câncer, e uma célula normal poderia gerar vesículas extracelulares com efeitos de reversão do câncer (QUESENBERRY et al., 2014).

Caivano e colaboradores (2015) demonstraram a presença elevada de vesículas extracelulares circulantes (exossomos e microvesículas) no soro de pacientes com diferentes tipos de desordens hematológicas neoplásicas, incluindo nas NMP e também na leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiplo (MM), leucemia linfocítica crônica (LLC) e síndromes mielodisplásicas (SMD), e que as MV poderiam representar um novo biomarcador (CAIVANO et al., 2015). Estudos mais amplos sobre o conteúdo das MV derivadas de MSC revelou a presença de componentes correlacionados à apoptose, proliferação celular, adesão, migração e morfogênese (CHEN; LI; CHEN, 2015; KIM et al., 2012a).

Um recente estudo em MM demonstrou que exossomos derivados de MSC na medula óssea interagem com as células MM e modulam o crescimento tumoral *in vivo*. O conteúdo de microRNA presente nos exossomos é diferente daqueles que são derivados de MSC normais e dos de pacientes com MM. No exossomo de MSC de MM são elevados os níveis de proteínas oncogênicas, citocinas e moléculas de adesão, o que seria responsável pelo favorecimento do crescimento tumoral; no exossomo derivados de MSC normais ocorre a promoção da inibição do crescimento tumoral (ROCCARO et al., 2013).

Uma vez que já existem relatos a respeito de disfunções em MSC em NMP, é importante saber se tais alterações se estendem também sobre as propriedades antitumorais, apoptóticas, imunomodulatórias e angiogênicas desempenhadas pelas MSC via sinalização por VE. Por manter a assinatura da célula que a originou, o estudo das VE pode auxiliar na identificação de alterações de celulares até mesmo transitórias, desencadeadas pela tumorigênese. Pelo presente exposto, se faz importante a elucidação da caracterização e função desempenhada pelas MSC nas NMP. Conhecer o comportamento das MSC de NMP, seu envolvimento com as patogêneses além das mutações condutoras, nesse caso, alterações do microambiente medular, inflamação, angiogênese e apoptose, e se a via de sinalização por VE atuaria nesses processos.

Nossa hipótese é que existam alterações nas MSC, produto de um condicionamento da célula neoplásica, e que isso esteja relacionado com a transformação tumoral do microambiente medular, contribuindo assim para a fisiopatologia das NMP.



 \Box

 Caracterizar as células estromais mesenquimais multipotentes (MSC) de pacientes com Neoplasias mieloproliferativas e controles quanto ao fenótipo, expressão gênica e função;

2) Avaliar o perfil de citocinas, quimiocinas e fatores pró-angiogênicos presentes no microambiente medular de pacientes com NMP e voluntários saudáveis.

2.1 Estratégias adotadas para o alcance dos objetivos

- Obtenção de MSC de pacientes com PV, TE, MF e controles;

 Cultivar, imunofenotipagem, determinação a capacidade multipotente e do perfil de crescimento das MSC de pacientes com NMP;

 - Quantificação e correlação de genes e microRNAs reguladores da apoptose em MSC de NMP e controles;

 Quantificação dos níveis de citocinas, quimiocinas e fatores pró-angiogênicos presentes no plasma de medula óssea de pacientes com NMP e controles, e criação do perfil imunológico de cada doença;

 Quantificação da expressão de genes reguladores da inflamação e angiogênese em MSC de PV e controles;

- Caracterizar os efeitos imunomodulatórios de MSC e sua sensibilidade ao indutor de apoptose estaurosporina.



П

O estudo teve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP e do HC/FMRP-USP (protocolo nº 408 – CAAE: 55545716.6.0000.5403 – 12 de agosto de 2016) (Anexo A e B). Todos os participantes da pesquisa (pacientes e controles) que concordaram em participar do nosso estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos D - G).

Os critérios de inclusão para o grupo de pacientes com NMP foram indivíduos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, sem histórico de outras neoplasias, doenças inflamatórias crônicas, autoimunes, neurodegenerativas, infecções virais e/ou bacterianas. Já para o grupo controle foram, maiores de 18 anos, ambos os sexos, sem histórico de doenças neoplásicas, inflamatórias crônicas, autoimunes, neurodegenerativas, infecções virais e/ou bacterianas, e que não façam uso de medicamentos.

Os critérios de exclusão foram para ambos os grupos, a não anuência com o TCLE, o uso de algum medicamento que gerasse interferência em alguma análise, a presença de doenças neoplásicas (à exceção dos pacientes com NMP), inflamatórias crônicas, autoimunes e neurodegenerativas, infecções virais e/ou bacterianas.

A seleção e recrutamento dos pacientes com NMP foi realizada em colaboração com os Professores Doutores Belinda Pinto-Simões, Fabíola Traina, Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes e Rodrigo do Tocantins Calado, do serviço de Hematologia do Departamento de Hematologia e Oncologia do HC/FMRP-USP. A seleção e recrutamento dos participantes do grupo controle foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues da Divisão de Imunologia Clínica, do Departamento de Clínica Médica da FMRP/USP.

3.1 Amostras de aspirado de medula óssea

Foram coletadas 57 amostras de aspirados de medula óssea e sangue periférico de pacientes adultos com suspeita de PV, TE e MF, sem tratamento. O diagnóstico dos pacientes pode ser visualizado na Tabela 2. Foram também coletadas 5 amostras de voluntários saudáveis durante o processo de doação de medula óssea. No Apêndice 1-3, foram informados os dados demográficos de todas amostras de aspirados de medula óssea coletados. **Tabela 2.** Características demográficas e diagnóstico das amostras de aspirados de medula óssea de pacientes com suspeita de Neoplasias mieloproliferativas e doadores de medula óssea (controles) obtidas durante o estudo.

Diagnóstico	Masculino	Feminino	Idade (mediana)
Policitemia vera	3	9	62 anos
			(31-72)
Trombocitemia	4	7	69 anos
essencial	4		(29-82)
Mielofibrose	7	7	68 anos
primária		, i	(51-75)
Policitemia	6	1	56 anos
secundária		I	(38-80)
Outros	1	5	68 anos
			(30-75)
Sem diagnóstico	5	2	63 anos
			(32-75)
Doadores de MO	3	2	34 anos
(controles)		£	(19-37)

Os participantes deste estudo foram agrupados em quatro grupos: CTRL (voluntários saudáveis). pacientes com PV (policitemia vera), TE (trombocitemia essencial) e MF (mielofibrose primária)

O grupo CTRL de medula óssea foi composto por cinco indivíduos, com média de idade de 30 anos (± 8,03 anos), sendo três do gênero masculino [média idade=30,66 anos (± 10,12 anos)] e dois do gênero feminino [média idade=29 anos (±7,07 anos)].

O grupo de pacientes com PV foi composto por 12 indivíduos com idade média de 60 anos (±10,12 anos), sendo três do gênero masculino [média idade=63 anos (±2,65 anos)] e nove do gênero feminino [média idade=59 anos (±12,65 anos)]. Todos os pacientes deste grupo apresentavam a mutação JAK2V617F.

O grupo de pacientes com TE foi composto por 11 indivíduos com idade média de 64,66 anos (±17,39 anos), sendo quatro do gênero masculino [média idade=68,67 anos (±10,41 anos)] e sete do gênero feminino [média idade=62,67 (±10,41 anos)]. A mutação JAK2V617F foi detectada em 54,55% dos indivíduos do grupo (n=6), a

mutação da CALR em 18,19% (n=2) e 27,26% dos pacientes foram negativos para as mutações JAK2V617F e CALR.

O grupo de pacientes com MF foi composto por 14 indivíduos com idade média de 64,36 anos (±11,01 anos), sendo sete do gênero masculino [média idade=59,17 (±10,54 anos)] e sete do gênero feminino [média idade=66,2 (±11,09 anos)]. A mutação JAK2V617F foi detectada em 71,42% dos indivíduos deste grupo (n=10), a mutação da CALR em 14,29% (n=2) e 14,29% dos pacientes foram negativos para as mutações JAK2V617F e CALR

3.2 Amostras de plasma de medula óssea

Foram avaliadas 51 amostras de plasma de medula óssea pertencentes ao Biorrepositório do Laboratório de Hematologia da FCFRP-USP sob responsabilidade da Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro (Anexo C), sendo 15 de pacientes com PV, 13 com TE, 11 com MF e 12 de indivíduos saudáveis (controles). Dados demográficos estão presentes no Apêndice 4.

4. Material e Métodos Г

4.1 Colheita de amostras de medula óssea

Foram colhidos dos participantes deste estudo, pelo médico hematologista, um volume entre três e oito mL de aspirado de MO da crista ilíaca, em tubos contendo o anticoagulante EDTA (Vacutainer®; Becton & Dickinson), durante a realização de exames de rotina diagnóstica (pacientes NMP) ou doação de MO (controles).

4.2 Colheita de amostras de sangue periférico

Foram colhidos, dos participantes do estudo, o volume de 20 mL de sangue venosa, em tubos à vácuo contendo o anticoagulante EDTA (Vacutainer®; Becton, Dickinson and Company). A colheita foi realizada por profissional de saúde devidamente habilitado e seguindo as normas de biossegurança aplicáveis.

4.3 Isolamento do plasma das amostras de sangue periférico e medula óssea

Os tubos contendo as amostras de sangue de medula óssea, e as de sangue periférico, foram previamente centrifugados a 300 x g durante 15 minutos na temperatura de 4^oC. O plasma, num volume de um a dois mL, foi devidamente recolhido e armazenado em freezer -80^oC.

4.4 Isolamento e Cultivo de MSC

As amostras de MO foram processadas em até três horas após a colheita para que não houvesse diminuição da viabilidade celular. A medula foi diluída na proporção de um volume de medula para dois volumes de tampão PBS e submetida ao procedimento de isolamento das células mononucleares pelo método de gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Science). Os tubos contendo células e Ficoll-Hypaque foram centrifugados com centrifugação por 30 minutos a 800 x *g*, sem breque e sem aceleração, em temperatura ambiente (TA). As células

presentes na interfase do Ficoll foram recolhidas e lavadas 2 vezes com 20mL de tampão PBS 1x, centrifugadas a 300 x *g*, por 10 minutos em TA.

As células mononucleares isoladas, na concentração de 2 a 4 x 10⁷, foram plaqueadas em frascos de cultivo celular de 75cm² e cultivadas à 37°C à 5% CO₂. O meio de cultivo utilizado foi o ALPHA-MEM (GIBCO[™], Thermo Fisher Scientific) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina 100x (GIBCO[™], Thermo Fisher Scientific), 1% de L-glutamina a 200mM (GIBCO[™], Thermo Fisher Scientific) e 15% de soro fetal bovino (SFB) HyClone (GE Healthcare Life Science).

O isolamento das MSC ocorre devido à sua característica de aderir ao frasco e expansão sem perda do potencial multipotente. Após o período de cinco a sete dias de cultivo, tempo necessário para aderência das MSC, o meio deve ser completamente substituído para a remoção das células não aderentes.

A cultura foi mantida até a confluência de 70 a 80% das células, com trocas de metade do meio a cada três dias para mantê-las viáveis.

Ao atingirem a confluência desejada, as células foram tripsinizadas para realização de novo repique e expansão. Com esta finalidade, o frasco T com as células foi colocado em estufa a 37°C por 5 minutos com quatro mL de solução TrypLE 1X (GIBCOTM, Thermo Fisher Scientific). Após incubação, para o desprendimento das células, o frasco T sofreu "batidas" leves em suas bordas e foram adicionados oito mL de meio ALPHA-MEM suplementado de 5% SBF para retirada de todas as células. As células foram lavadas em PBS, centrifugadas a 300 x *g* por 10 min a TA e cultivadas na concentração de 5 x 10^5 células em um frasco T 75cm² com 14mL de meio de cultivo ALPHA-MEM.

Por se tratar de uma cultura primária, o processo de expansão para criação do banco mãe foi realizado entre as passagens 0 a 3. As células na concentração de 1x 10⁶ células por tubo criogênico foram congeladas em solução de SBF com 10% DMSO 4em nitrogênio líquido.

Todos os experimentos realizados nesse estudo utilizaram MSC entre as passagens 3-5.

4.5 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

As amostras de sangue periférico, de voluntários saudáveis, foram processadas logo após a colheita. Inicialmente, o sangue foi diluído na proporção um volume de sangue para dois volumes de tampão PBS e submetido a separação pelo uso do método de gradiente de densidade Ficoll Hypaque (GE Healthcare Life Science), conforme descrito no item 4.4.

As células mononucleares foram contadas e congeladas em solução SBF + 10% DMSO contendo 5x10⁷ células por tubo até o momento de uso no ensaio descrito no item 4.8.

4.6 Ensaio de Diferenciação da MSC em Adipócitos e Osteócitos

Os ensaios multifuncionais de indução da diferenciação das MSC foram realizados utilizando os kits comerciais *StemPro™ Adipogenesis differentiation kit* e *StemPro™ Osteogenesis Differentiation kit* (ambos GIBCO™, Thermo Fisher Scientific).

As MSC nas passagens 3-4 foram plaqueadas na em placas para cultivo celular de 24 poços (Greiner CELLSTAR[®], MERCK). A densidade celular para os três poços controle foi de 2.000 células por cm², e 3.000 células por cm² para os três poços-teste, nos quais a diferenciação foi induzida. Em todos os poços as células foram cultivadas com meio de cultivo ALPHA-MEM, a 37°C a 5% CO₂. A troca de metade do meio ocorria a cada 3 dias, até que as células atingissem a confluência de 70%. Neste estágio, todo o meio dos poços-teste foi recolhido, descartado e substituído por meio indutor da diferenciação fornecido pelo "kit". As condições de cultivo foram mantidas e a troca de metade do meio ocorreu a cada três dias. O processo de diferenciação celular para adipócitos foi observado entre o quinto e décimo segundo dia pós-indução, e para o de osteócito entre o oitavo e décimo quinto dia pós-indução.

Para análise e identificação dos adipócitos, foi realizada a coloração de Sudan *III*, para observação do acúmulo de vesículas de gordura no citoplasma. As células diferenciadas foram fixadas utilizando 300 µL da solução de paraformaldeído 4% em tampão PBS, por 30 minutos.

Após a fixação das células, os poços foram lavados com um mL de água milli-Q três vezes e recobertos com 300 µL de etanol 70% por três minutos. Em seguida, o etanol foi descartado e foram adicionados aos poços Sudan II Escarlarte por 30 minutos. O corante foi retirado e os poços foram lavados uma vez com um mL de etanol 70% e três vezes com 1mL de água milli-Q. A seguir as células foram contra coradas com 700µL de hematoxilina de Harris por dois minutos e lavadas três vezes com 1mL de água milli-Q.

A identificação dos adipócitos é verificada pela coloração alaranjada característica do Sudan, e as células não diferenciadas se coram de roxo azulado. Para a identificação dos osteócitos foi realizada a coloração de *von Kossa*, que permite a visualização da deposição de cálcio na matriz celular dos osteócitos. Após a fixação e lavagem das células nos poços, 700 µL de solução de nitrato de prata 5% foram adicionados por 30 minutos ao abrigo de luz. Após este período, o nitrato de prata foi descartado e a placa com as células foi exposta à luz branca (lâmpada de 100 W) por 60 minutos. Após esse procedimento, os poços com as células foram incubados por dois minutos com 300 µL da solução de tiossulfato de sódio 5% e lavados por três vezes com um mL de água milli-Q. Novamente, as células foram contra coradas com 700 µL de hematoxilina de Harris por dois minutos seguida de três lavagens com um mL de água milli-Q. Tanto os osteócitos como as células não diferenciadas ficam com a coloração roxo azulada, mas os osteócitos podem ser diferenciados pela observação dos grânulos na cor marrom no citoplasma.

Para visualização das estruturas celulares coradas foi empregado o microscópio de fase invertida Olympus DP71 (Olympus) e o software de captura DP Controller (Olympus) para fotografar e documentar os resultados gerados.

4.7 Caracterização Imunofenotípica das MSC

A caracterização imunofenotípica das MSC foi realizada por citometria de fluxo, no equipamento *FACSCalibur*[™] (BD Biosciences).

As suspensões de células, na concentração de 1-2x10⁵ em 200 µl, obtidas entre as passagens três e quatro do cultivo, foram marcadas com 5 µl de cada anticorpo (Tabela 3), incubados por 20 minutos, na temperatura ambiente e no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em 200 µl de tampão PBS e analisadas no citômetro de fluxo. Os anticorpos empregados para marcação dos antígenos de membrana da MSC estão descritos na Tabela 3. Foram adquiridos 10.000 eventos e os resultados foram analisados por meio do *software* BD FACSDIVA 8.0.1 (BD Biosciences). Os resultados foram expressos em percentagem de células marcadas.

ALVO	ANTICORPO	CONJUGADO	CLONE
CD13	Anti-CD 3	APC	WN15
CD29	Anti-CD29	APC	MAR4
CD31	Anti-CD31	FITC	WM59
CD34	Anti-CD34	PerCP	8G12
CD44	Anti-CD44	FITC	M1
CD45/14	Anti-CD45/14	FITC, PE	MøP9, 2D1
CD49e	Anti-CD49e	PE	IIA1
CD51/61	Anti-CD51/61	FITC	23C6
CD54	Anti-CD54	PE	HA58
CD73	Anti-CD73	PE	AD2
CD90	Anti-CD90	PE	5E10
CD105	Anti-CD105	PE-Cy5	266
CD106	Anti-CD106	FITC	51-10C9
CD166	Anti-CD166	PE	3A6
HLA-DR	Anti-HLA-DR	FITC	G46-6

Tabela 3. Anticorpos (BD Biosciences) utilizados para a caracterização dos antígenos de superfície de membrana celular de MSC por Citometria de Fluxo.

4.8 Ensaio de cocultivo de células mononucleares e MSC: Detecção do potencial imunossupressor das MSC

Em uma placa de cultivo celular com 48 poços (Greiner CELLSTAR[®], MERCK) foram plaqueadas, em triplicata, em meio de cultivo ALPHA-MEM, MSC em diferentes concentrações: 1,25 x 10⁵, 5 x 10⁴, 2,5 x 10⁴, 1,25 x 10⁴ e 5 x 10³ células/mL. A placa foi mantida em estufa à 37°C e 5% CO₂, "*overnight*", para adesão das MSC à placa.

No dia seguinte, as células mononucleares, previamente isoladas (item 4.5) foram descongeladas e de $1-3 \times 10^7$ células foram ressuspendidas em dois a quatro mililitros de tampão PBS suplementado de 0,1% albumina humana sérica (HSA,

SIGMA-ALDRICH[®], MERCK). As células mononucleares foram marcadas com o corante fluorescente CFSE (do inglês, *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester;* SIGMA-ALDRICH[®], MERCK), por 10 minutos, a 37°C, usando uma solução de CFSE estoque na concentração de 5 μ M em PBS suplementado com 0,1% HSA. A marcação foi interrompida com a adição de cinco volumes de meio RPMI suplementado com 10% SBF gelado, seguida de incubação durante cinco minutos em gelo e no escuro. As células mononucleares foram centrifugadas a 400 x *g*, por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com 20 mL de meio RPMI suplementado com 10% SBF gelado. No final deste processo de lavagem, as células mononucleares foram contadas e a suspensão celular ajustada para a concentração de 2,5 x10⁵ células/mL.

Após o procedimento de preparo das células mononucleares, o meio de cultura da placa celular de MSC de 48 poços foi retirado e um mL da suspensão das células mononucleares foi adicionado a cada poço. Para estimular a proliferação das células mononucleares foram adicionados 3,12 µL de *beads* magnéticas CD3/CD28 (*Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28*, Thermo Fisher Scientific), respeitando-se a proporção 1:1 bead/célula T, conforme as instruções do fabricante.

A placa continha como controle: 1) seis poços com 2,5 x 10^5 células mononucleares por mL marcados com CFSE; 2) seis poços com 2,5 x 10^5 células mononucleares por mL sem marcação; 3) três poços com 2,5 x 10^5 células mononucleares por mL marcadas com CFSE e estimulados com as *beads* CD3/CD28 (C⁺).

A placa foi incubada por cinco dias, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Mas após as primeiras 24 horas, um poço controle de células mononucleares não marcadas e um poço controle células mononucleares marcadas, foram recolhidos e analisados em citômetro de fluxo *FACSCalibur*[™] (BD Biosciences), para a confirmação da marcação.

Ao fim das 120 horas de incubação, todos as células mononucleares foram recolhidas, e marcadas com 5µL dos anticorpos anti-CD4 e CD8 (BD Biosciences), seguindo o mesmo protocolo do tópico 4.7.

Foram analisados 10.000 eventos, dentro da *gate* específicas de CD4⁺ e CD8⁺. Os resultados foram mostrados em *dot plot*, sendo considerado o percentual de células positivas para o CFSE na presença ou não de MSC, utilizando *software* BD FACSDIVA 8.0.1 (BD Biosciences).

Para o cálculo do percentual de inibição da proliferação de mononucleares CD4⁺ e CD8⁺ foi utilizado a seguinte equação:

$$Inibição~(\%) = \left(\frac{(C^+ CFSE \ low) - (PBMCs + MSC \ CFSE \ low)}{(C^+ \ CFSE \ low)}\right) \times 100$$

Sendo o "C⁺ CFSE low" dado pela média do percentual *low* para a marcação com CFSE, de células mononucleares que foram estimulados com *beads* CD3/CD28 e cultivadas sem a presença de MSC. E "PBMCs + MSC CFSE low" para a média do percentual *low* para a marcação com CFSE, de células mononucleares que foram estimulados com beads CD3/CD8 e cultivadas na presença de MSC. Para cada concentração de MSC utilizada foi calculado a sua média do percentual *low* de CFSE e seu % inibição. Foi calculado separadamente o percentual de inibição para as células T CD4⁺ e CD8⁺.

O percentual da marcação com o CFSE decai exponencialmente conforme a célula prolifera. Nos poços com os controles designados como 1, nos quais há células mononucleares marcadas com CFSE sem estímulo, o pico do CFSE permanecerá único com um pequeno decaimento, configurando ausência de proliferação. Nos poços controles designados como 3 (C⁺), nos quais há células mononucleares marcadas com CFSE estimulados com *beads*, a marcação do CFSE decairá, configurando o máximo de proliferação celular.

4.9 Cálculo do tempo de duplicação (doubling time) do número de MSC

Amostras de MSC, entre as passagens três e quatro, foram adicionadas em placas de 24 poços (Greiner CELLSTAR[®], MERCK) na concentração de 3.000 células/cm²/poço em um mL de meio de cultivo ALPHA-MEM e cultivadas por sete dias, em estufa a 37°C e 5% CO₂. A cada 24 horas, três poços eram tripsinizados e as MSC contadas. A viabilidade celular também foi determinada durante este ensaio por meio da solução de corante celular *Trypan blue 0,4%* (GIBCO[™], Thermo Fisher Scientific). Para o cálculo de *Doubling time* (DT) da população celular foi utilizado à equação pré-estabelecida:

$$DT = \frac{\mathsf{t} \times \log 2}{\log\left(\frac{n}{n_0}\right)}$$

Sendo o "t" o tempo de cultivo, "n" número total de células contadas ao final do experimento, e " n_o " o número total de células contadas no início do experimento.

Para a elaboração da curva de crescimento das MSC, os valores diários da destas células foram analisados no *software* Prisma 6.0 (GraphPad) e uma curva de crescimento exponencial foi gerada.

4.10 Determinação da sensibilidade das MSC à estaurosporina

Para determinação da viabilidade celular pelo método do MTT, vinte mil MSC, das passagens 3 e 4, foram plaqueadas em placas de 96 poços (Greiner CELLSTAR[®], MERCK) e cultivadas em meio ALPHA-MEM, deixadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% CO₂, para adesão das células.

Após este período, as células foram tratadas com 100 ul do indutor de morte estaurosporina (5,36mM – SIGMA-ALDRICH[®], MERCK) nas concentrações 10 μ M, 3,3 μ M, 1 μ M, 0,3 μ M, 0,1 μ M, 0,03 μ M, 0,01 μ M, 0,003 μ M, 0,001 μ M e 0,0003 μ M e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. O controle negativo foi representado pelas células cultivadas apenas em meio de cultura completo.

Em seguida, 20 µL do corante MTT [brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2yl)2,5difeniltetrazólio; 2,5mg/mL, SIGMA-ALDRICH[®], MERCK] foram adicionados em cada e a placa foi incubada por 4h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após este período, a placa foi centrifugada por 800 x g durante 10 minutos em TA e os sobrenadantes dos poços foram removidos cuidadosamente para que as células permanecessem aderidas. A seguir, 200 µL de DMSO foram adicionados aos poços e as células foram reincubadas por 30 minutos a 37°C na estufa de 5% de CO₂. Após esta incubação, a placa foi retirada da estufa e a leitura da densidade óptica da cor formada foi realizada no espectrofotômetro *SpectraMax i3* (*Molecular Devices*, Estados Unidos) a 570nm. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular calculados através da formula:

$$Viabilidade~(\%) = \left(\frac{(\% \text{ máximo de UA CTRL NEG})}{(\% \text{ máximo de UA estaurosporina})}\right) \times 100$$

Sendo "% máximo de UA CTRL NEG" a média do percentual máximo de UA (unidades de absorbância) dos poços em que a MSC não foi cultivada com a

estaurosporina. E "% máximo de UA estaurosporina" a média do percentual de UA dos poços onde a MSC foi cultivada com a estaurosporina. Para cada concentração de estaurosporina utilizada foi calculado o respectivo % máximo de UA e % de viabilidade.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.11 Isolamento de vesículas extracelulares derivadas de MSC

As vesículas extracelulares foram isoladas do sobrenadante de cultura das células MSC dos pacientes com policitemia vera e controles durante as passagens três e quatro. Antes do isolamento, as células foram cultivadas a 37°C em 5% de CO₂, por cerca de quatro a seis dias, em meio de cultivo ALPHA-MEM até atingirem 70% de confluência. Todo o sobrenadante foi então retirado, a garrafa foi lavada cuidadosamente duas vezes com 10 mL de meio ALPHA-MEM incompleto para total retirada do sobrenadante e então 14 mL de meio de cultivo ALPHA-MEM foram adicionados previamente ultracentrifugado, onde houve a remoção de microvesículas bovinas presentes no SBF. As células foram cultivadas por mais 48h, e todo o sobrenadante foi removido.

Após a remoção do sobrenadante que contém as vesículas celulares, houve um processamento dele para a remoção de *debris* e células mortas, seguindo o protocolo adaptado (THÉRY et al., 2006). Assim, foi realizado várias etapas de centrifugações diferenciais com o aumento sucessivo de velocidade e todas a 4°C: $300 \times g$ por 10 minutos, $1.200 \times g$ por 20 minutos e $10.000 \times g$ por 30 minutos. Ao final de cada centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. O total de sobrenadante foi então filtrado pela membrana estéril PES 0.22μ m (KASVI) e armazenado a -20° C.

Para a obtenção das vesículas extracelulares por ultracentrifugação, o sobrenadante filtrado foi dividido em igual volume em tubos específicos (*thickwall polyallomer tubes – Beckman Coulter*_®). Os tubos, contendo as amostras, foram acondicionadas na centrífuga com rotor de ângulo fixo 90Ti e centrifugadas a 100.000 x *g*, por 70 minutos a 4°C, em ultracentrífuga *Optima*[™] *XL-100k* (*Beckman Coulter*_®, *Estados Unidos*). Em seguida, todo o sobrenadante foi cuidadosamente removido, e o pellet lavado com 1mL de tampão PBS 1x, e novamente centrifugado a 100.000x*g*

por 70 minutos a 4ºC. O *pellet* final, enriquecido com vesículas extracelulares, foi ressuspendido em 200 µL de tampão PBS e armazenado à -80ºC para análises futuras de caracterização e expressão gênica por PCR em tempo real.

4.12 Caracterização de vesículas extracelulares derivadas de MSC quanto ao tamanho e concentração

As vesículas extracelulares, derivadas de MSC dos pacientes com PV e controles foram caracterizadas quanto ao tamanho e concentração utilizando o aparelho *NanoSight NS300 (MALVERN, Reino Unido*). Este equipamento mede tamanho por meio da observação direta seguida de quantificação de eventos de difusão. Para esta determinação foram empregados o volume de 20µL de vesículas extracelulares diluídas na proporção de 1 volume de partículas para 49 volumes de tampão PBS 1x. Os resultados da concentração foram expressos em partículas/mL e dos de tamanho em nm.

4.13 Extração de RNA de MSC

Um total de 1-2x10⁶ MSC foram submetidos à extração de RNA de pelo método de Trizol[®] (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), conforme as instruções do fabricante.

Ao lisado celular em trizol foram adicionados 10 μ L de glicogênio (20 μ g/ μ L -Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e a mistura foi incubada por cinco minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 300 μ L de clorofórmio gelado (SIGMA-ALDRICH[®], MERCK) ao lisado e a mistura foi submetida a agitação por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas a 4°C, por 15 minutos, a 12.000 x g e a fase aquosa transferida para um novo microtubo de 1,5mL. Ao novo tubo foram adicionados 500 μ L de isopropanol gelado e as amostras foram incubadas por 12 horas a temperatura de -20°C. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi desprezado com cuidado. Ao "pellet" foram adicionados 500 μ L de etanol 70/% gelado as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de RNA, após seco, foi ressuspendido em 13 μ L de água livre de DNAse e RNAse, quantificado e armazenado em freezer -80°C. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare) a 260 nm.

4.14 Extração de RNA de vesículas extracelulares de MSC

Após a ultracentrifugação do sobrenadante de MSC (~10 mL contendo $1-2x10^6$ células), o pellet enriquecido de vesículas extracelulares foi ressuspendido em 250 µL de Trizol[®] (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e armazenados em freezer -80°C. Após o descongelamento das células em Trizol[®], foram adicionados 10 µL de glicogênio ($20\mu g/\mu L$ - Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e incubado por 5 minutos em TA. A seguir, foram adicionados ao pellet 250 µL de clorofórmio gelado, e agitado por 15 segundos. A amostra foi centrifugada a 12.000 x *g*, por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados, ao novo tubo, 200 µL de isopropanol gelado e o conteúdo foi homogeneizado levemente por inversão. As amostras, homogeneizadas, foram incubadas *overnight* em freezer -20°C para a precipitação do RNA total. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado O "pellet" de cada amostra foi lavado com 600µL de etanol 70% gelado e seco a temperatura ambiente. Após a secagem, o *pellet* foi ressuspenso com 10µL de água livre de DNAse e RNAse e armazenado em freezer -80°C.

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro *NanoVue* (GE Healthcare), a 260 nm.

4.15 Síntese de cDNA e quantificação de genes por PCR em tempo real

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o kit *High Capacity cDNA reverse transcription*[®] (Applied Byosystems[®], Thermo Fisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante. Para as amostras de MSC foi usado 1 µg de RNA e para as amostras de vesículas extracelulares foi usado 0,7 µg de RNA para síntese de cDNA.

O ciclo, para a polimerização do cDNA, empregado foi de 10 minutos a 25°C para o anelamento e de duas horas a 37°C para a extensão de novas fitas no termociclador *Mastercycler*[®] (Eppendorf). O cDNA obtido foi armazenado em -20°C

até sua utilização. Para as análises da expressão gênica das amostras de MSC por PCR em tempo real, o cDNA foi diluído na proporção de uma parte do cDNA para três partes de água. O cDNA, das amostras de vesículas extracelulares de MSC foi empregado, nas reações de real time PCR, sem diluição prévia.

Os ensaios de quantificação de genes utilizaram o kit *TaqMan gene expression assay* (Applied Byosystems[®], Thermo Fisher Scientific) e o kit *SYBR Green master mix* (Thermo Fisher Scientific). As sondas e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para quantificação da expressão dos genes alvo e de referência foram descritos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

O equipamento utilizado foi o Step One Plus Real Time PCR System (Applied Byosystems[®], Thermo Fisher Scientific).

Gene alvo	Referência Thermo Scientific
IL6	Hs00174131_m1
CXCL8	Hs00174103_m1
IL10	Hs00961619_m1
TNF	Hs00174128_m1
IFNG	Hs00989291_m1
VEGF	Hs00900055_m1
GAPDH	Hs99999905_m1

Tabela 4. Sondas utilizadas nos ensaios *TaqMan* para quantificação de expressão gênica em MSC e vesículas extracelulares de MSC.

*nomenclatura de acordo com o HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)

Tabela 5. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de expressão gênica em MSC, cujo método aplicado foi o *SYBR Green*.

Gene	Oligonucleotídeo sense	Oligonucleotídeo anti-sense
alvo		
BAK1	ACAAACTGGCCCAACAGAAC	TCTGGCCCTACACGTCTACC
BCL2	ACGAGTGGGATGCGGGAGATGTG	GCGGTAGCGGCGGGAGAAGTC
BIRC2	GCCGAGGAAGATAAGCA	GCCCAGGGAAGTGAAGGT
MCL1	AGAAAGCTGCATCGAACCAT	CCAGCTCCTACTCCAGCAAC
ACTB	GACAGCAGTCGGTTGGACC	CAGGTAAGCCCTGGCTGC
B2M	CCAGCGTACTCCAAAGATTCA	TGGATAAACCCAGACACATAG

*nomenclatura de acordo com o HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)

O gene de referência utilizado no ensaio *TaqMan* foi o *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), no ensaio de expressão gênica empregando-se o *SYBR* foram utilizados *ACTB* (Beta-actina) e *B2M* (Beta-2-microglobulina). Os resultados foram expressos em URE (unidades relativas de expressão, URE=10000/2^{Δ Ct}). Sendo, Δ Ct= Ct do gene alvo – média do Ct dos genes endógenos.

4.16 Síntese de cDNA e quantificação de microRNAs por PCR em tempo real de MSC e vesículas extracelulares derivadas de MSC

Após a extração do RNA total, a síntese do cDNA para os microRNAs de interesse foi realizada no mesmo dia de utilização da análise dos microRNAs por PCR real time. As amostras de RNA armazenadas no freezer -80°C foram diluídas para a concentração final de 2,5 ng/µL. Para a transcrição reversa foram utilizados *primers* RT *stem loop* específicos (Applied Byosystems[®], Thermo Fisher Scientific) para cada microRNA pesquisado.

Os cDNAs obtidos de MSC foram diluídos na proporção de uma parte de cDNA e três de água (1:3) para os ensaios de PCR em tempo real. Os cDNAs obtidos de RNA de vesículas extracelulares derivadas de MSC foram usados sem diluir.

Foi utilizado o kit *TaqMan microRNA assay Human* (Applied Byosystems[®], Thermo Fisher Scientific) contendo sondas *TaqMan* específicas para cada microRNA analisado (Tabela 6), seguindo especificações do fabricante, no equipamento Step One Plus Real Time PCR System (Applied Byosystems[®], Thermo Fisher Scientific). Os miRNAs de referência utilizados (endógenos) foram o RNU24, RNU6b e RNU48. Para a quantificação em vesículas, os CT dos microRNAs foram normalizados pelo miR referência MIR126.

miRNA	Referência Thermo Fisher Scientific (#4227975)
MIR15A	ID 000389
MIR16-2	ID 477931_mir
MIR21	ID 477973_mir
MIR29C	ID 479229_mir
MIR130B	ID 000456
MIR199B	ID 000500
MIR126	ID 002228
MIR132	ID 477900_mir
RNU6B	ID 001093
RNU24	ID 001001
RNU48	ID 001006

Tabela 6. Referência das sondas utilizados nos ensaios *TaqMan* na quantificação da expressão de microRNAs.

*nomenclatura de acordo com o HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC).

4.17 Ensaio multiplex para quantificação de citocinas e quimiocinas

Para a quantificação de citocinas e quimiocinas do plasma da medula óssea de pacientes com NMP e controles foi utilizado o kit customizado *Human Magnetic Luminex*[®] *Assay* (*R* & *D Systems*) para dosagem dos seguintes analíticos: MCP-1, CXCL12, CXCL8, IL-1β, GM-CSF, IL-17a, IL-6R, IL-6, VEGFR2, VEGF-A, RANTES, HGF, IL-10, IL-18, M-CSF, CXCL10, G-CSF, IFN-γ, IL-12 e TNF-α.

O ensaio foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante, que estavam presentes na bula do *kit*. Foram pipetados, na placa do ensaio, 75 µL de plasma de MO de pacientes com NMP e voluntários saudáveis (CTRL) diluídos (1:2) em solução diluente RD6-52.

A placa contendo as amostras foi lida para captura de *Beads* fluorescentes específicas pelo aparelho *MAGPIX®* (*Luminex – MERCK*) e os dados obtidos foram analisados pelo *software xPONENT* (*Luminex – MERCK*). Os resultados foram expressos em pg/mL.

Os dados brutos gerados foram usados para as análises do perfil de citocinas de cada grupo. Os resultados foram calculados de acordo com o exposto na literatura (VITELLI-AVELAR et al., 2008).

A correlação entre os níveis de citocinas /quimiocinas analisadas foi criada utilizando o *software* Cytoscape (versão 3.7) disponível em https://www.cytoscape.org). Os *bitmaps* e os gráficos em radar foram gerados tabulando os dados de produção das citocinas/quimiocinas em cada grupo, utilizando o *software Microsoft Excel* (Microsoft Office 2016).

4.18 Análise dos prontuários de pacientes com NMP

Os prontuários médicos dos pacientes do HCFMRP-USP foram utilizados para obtenção dos dados demográficos e clínico-laboratoriais dos pacientes, cujas amostras foram analisadas neste estudo.

4.19 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* Prisma 6.0 (GraphPad), sendo considerado o resultado significativo quando o valor de foi p<0,05.

As análises estatísticas utilizadas foram: 1) teste *t student* para as análises de tempo de duplicação; 2) teste de correlação de *Spearman* nas análises de correlação entre as dosagens de das citocinas, quimiocinas e fatores pró-angiogênicos; expressão de genes e microRNAs; 3) teste não paramétrico *Mann-Whitney* foi utilizado nas demais análises comparativas realizadas neste estudo.
5. Resultados П

п

5.1 Caracterização de MSC isoladas de pacientes com NMP e CTRL

As MSC isoladas de pacientes dos grupos de PV, TE e MF apresentaram, em cultura, morfologia característica fibroblastoíde e semelhante às MSC do grupo CTRL. Contudo, apenas o grupo dos pacientes com NMP apresentaram amostras de MSC que não conseguiram expandir (Tabela 7). As MSC não expandiram em dois momentos distintos: no isolamento (passagem 0) e durante o cultivo antes do primeiro repique. Nestes casos, durante o processo de isolamento houve pouca adesão de MSC, e àquelas que aderiram foram insuficientes para gerar colônias de expansão morrendo antes do primeiro repique.

As amostras que não expandiram no grupo PV representaram 35% (n=3), sendo uma durante o processo de isolamento e duas durante o cultivo celular. No grupo de TE houve a perda de duas MSC no ato de isolamento, representando 9,09% da amostragem. O maior percentual de perda de amostra ocorreu no grupo de MF, com 78% (n=7), sendo quatro amostras no processo de isolamento e três durante o cultivo celular.

Cinco amostras foram perdidas devido um defeito da estufa utilizada, sendo uma do grupo PV, uma do grupo TE e 3 do grupo MF.

O perfil imunofenotípico das MSC, adotado por nosso grupo, baseia-se na alta positividade para a marcação dos antígenos de superfície CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166 e CD49e, marcação positiva intermediária para CD54, e marcação negativa para HLA-DR, CD31, CD34, CD106, CD51/61, CD14 e CD45.

A caracterização imunofenotípica das MSC (Figuras 1 e 2) mostrou que todos os grupos de pacientes estudados e controles exibiram MSC com imunofenótipo característico e de acordo com a ISCT (DOMINICI et al., 2006). Contudo, foram encontradas diferenças nas porcentagens de células positivas para alguns antígenos de superfície (Tabela 8). O grupo de TE exibiu a menor expressão dos antígenos de superfície CD90, CD105 e CD13, quando comparado ao grupo PV. O grupo de MF apresentou tendência a menor expressão dos antígenos CD90 e CD105, quando comparado com o grupo PV; e de CD13 entre o grupo TE. Na comparação dos resultados de expressão dos marcadores das MSC entre os grupos de pacientes e o grupo CTRL não foi observado nenhuma diferença no perfil imunofenotípico.

	CTRL	PV	TE	MF
Total amostras coletadas	5	12	11	14
Insucessos P0 Pós- P0		35% (3) 1 2	9,09% (2) 2	78% (7) 4 3
Falha da estufa		1	1	3
Cultura estabelecidas	5	8	8	4
Grupo de estudo	5	8	4	3

Tabela 7. Resultados da eficiência do isolamento das MSC entre os grupos CTRL, PV, TE e MF.

CTRL: controle; PV: policitrmia vera; TE: tromobocitemia essencial e MF: mielofibrose primária.

Tabela 8. Resultados das análises da expressão dos marcadores de superfície CD90, CD105, CD73, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD166 e CD54 das MSC de pacientes com NMP e grupo CTRL.

	Antígenos de Superfície								
Comparações	CD90	CD105	CD73	CD13	CD29	CD44	CD49e	CD166	CD54
CTRL x PV	0,1465	0,2424	0,5025	0,4116	0,4312	0,6010	0,8424	0,3524	0,4116
CTRL x TE	0,5238	0,1143	0,2857	0,1111	>0,9999	0,3968	0,1143	0,2000	0,1111
CTRL x MF	0,3810	>0,9999	0,8571	0,1905	0,2857	0,2857	0,2667	0,4000	0,0952
PV x TE	0,0424	0,0381	0,1576	0,0121	0,3333	0,2182	0,2970	0,1714	0,0242
PV x MF	0,0556	0,2143	>0,9999	0,0556	0,1111	0,0556	0,2222	0,6429	0,0556
TE x MF	0,5333	>0,9999	0,2667	0,4000	0,4000	0,5333	>0,9999	0,5333	>0,9999
Medianas									
CTRL	97,69	93,22	94,24	96,48	91,69	89,13	93,62	92,62	53,28
PV	98,5	97,40	95,49	97,44	97,3	92,43	94,48	88,49	61,05
TE	95,77	79,86	84,38	91,07	84,17	82,53	80,62	74,75	30,94
MF	94,29	62,84	94,29	69,15	77,15	73,40	63,67	79,58	23,86

Teste estatístico de Mann-Whitney. Foram consideradas significantes as análises cujo *p*<0,05. CTRL: controle; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial e MF: mielofibrose primária.



Figura 1. Caracterização imunofenotípica das MSC de controles e pacientes quanto aos antígenos CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD49e e CD166. MSC dos grupos CTRL (n=5), PV (n=7), TE (n=4) e MF (n=2). Resultados foram expressos em percentual de células positivas, e as barras horizontais indicam medianas e *range* dos 10.000 eventos analisados. Teste estatístico de Mann-Whitney.



Figura 2. Caracterização imunofenotípica dos antígenos de superfície CD54, HLA-DR, CD106, CD51/61, CD34, CD31, CD14 e CD45. MSC dos grupos CTRL (n=5), PV (n=7), TE (n=4) e MF (n=2). Resultados foram expressos em percentual de células positivas, e as barras horizontais indicam as medianas e *range* dos 10.000 eventos analisados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Para avaliar o potencial de diferenciação celular das MSC foram realizados os ensaios de indução de diferenciação dessas células em adipócitos e osteócitos. As MSC isoladas e expandidas dos grupos CTRL (n=5), PV (n=8), TE (n=4) e MF (n=3) de todos os grupos foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos. A figura 3 ilustra a diferenciação das MSC em adipócitos e osteócitos de um indivíduo de cada grupo (de NMP e controle) avaliado.



Figura 3. Diferenciação *das* MSC (A) dos grupos CTRL, PV, TE e MF em adipócitos (coloração de Sudam III; B) e osteócitos (coloração von kossa; C). Imagens no aumento 20x, no microscópio de fase invertida Olympus DP71.

5.2 Cinética de crescimento e perfil de crescimento de MSC

Para identificar possíveis alterações no potencial proliferativo apresentado pelas MSC de pacientes com PV (n=3), TE (n=3, JAK2+) e MF (n=1, JAK2+), e de do grupo CTRL (n=4), foram realizados ensaios de avaliação da cinética de crescimento.

As MSC foram acompanhadas até atingirem confluência (entre cinco a sete dias), e a cada 24h o número de células foi contado e a viabilidade estimada utilizando o reagente Trypan blue 4% v/v. Ao término os dados foram analisados, levando em consideração o número de células pelo tempo, um gráfico foi criado e gerado uma linha de crescimento exponencial, usando o *software* Prisma 6.0 (GraphPad). Utilizando uma equação já pré-estabelecida (demonstrada no item 4.9) para o cálculo do tempo de duplicação celular (DT).

A cinética de crescimento apresentada por cada grupo pode ser observada na Figura 4.

O grupo controle apresentou um DT médio de 2,627 dias (63,05 horas). O grupo PV por sua vez, apresentou um DT médio de 3,440 dias (82,56 horas), e o TE de 3,774 dias (89,62 horas). A amostra de MSC de um paciente com MF exibiu um DT de 4,572 dias (109,73 horas) (Figura 5).

As análises de comparação entre os DT apresentados pelos grupos PV, TE e CTRL não revelou nenhuma diferença estatística entre eles (Tabela 9).

Análise	Valor de p				
PV x CTRL	0,2000				
TE x CTRL	0,7000				
PV x TE	0,7000				
DT	Média	Desvio padrão			
CTRL	2,627 dias	±0,447			
PV	3,440 dias	±0,877			
TE	3,744 dias	±1,492			
MF	4,572 dias*	-			

Tabela 9. Resultados das análises comparativas dos tempos de duplicação (DT) de MSC dos grupos PV (n=3), TE (n=3) e CTRL (n=4). Teste de Mann-Whitney.

Teste estatístico de Mann-Whitney. Foram consideradas significantes as comparações cujo valor de *p foi <0,05.* CTRL: controle; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial e MF: mielofibrose primária. *Resultado referente a um paciente, portanto não se trata da média.



Figura 4. Perfil de cinética de crescimento das MSC dos grupos PV (n=3), TE (n=3), MF (n=1) e CTRL (n=4). A curva exponencial de crescimento foi gerada utilizando o software Prisma 6.0 (GraphPad). Teste estatístico de Mann-Whitney. Os valores plotados correspondem às médias e desvios padrão das contagens realizadas em triplicata.



Figura 5. Tempo de duplicação (DT) das MSC pertencente aos grupos PV (n=3), TE (n=3, JAK2), MF (n=1, JAK2) e CTRL (n=4). Teste estatístico de Mann-Whitney.

Embora não tenhamos observado diferenças nas análises estatísticas efetuadas, destacamos que o DT das MSC de pacientes com NMP difere das MSC do grupo CTRL, exibindo uma proliferação mais lenta, especialmente na MF. As MSC

de pacientes com NMP exibem um *fold change* de 1,31 para PV, 1,42 para TE e 1,74 para MF.

Além disso, as MSC isoladas de pacientes com NMP foram as únicas a exibiram problemas no estabelecimento ou durante o processo de cultura celular, principalmente de pacientes com MF e TE. Durante o cultivo, uma expansão lenta foi observada, comparada da apresentada pela MSC do grupo controle, além de morfologia senescente.

5.3 Imunomodulação das células mononucleares de indivíduo saudáveis pelas MSC de pacientes com PV

Os ensaios de cocultivo de MSC, pertencentes ao grupo CTRL (n=3) e PV (n=5), com células mononucleares alogênicas de sangue periférico de doador saudável, foram realizados para a avalição do potencial inibitório de MSC na proliferação de células mononucleares, em específico nas subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺. As células mononucleares não proliferam quando apenas cultivadas em meio de cultura sem a adição de um estímulo proliferativo. Nesse sentido, as *beads* CD3/CD28 conferem um estímulo específico que promove a ativação e proliferação de células CD3/CD28⁺. A mediana de proliferação apresentada pelo C+ (controle positivo) do grupo CTRL foi de 99,66 para as células T CD4+, e de 97,23 para células CD8+. No grupo PV, a mediana de proliferaçãodo C+ foi de CD4+ foi de 97,04 e CD8+ de 91,60 (Tabela 10).

No grupo CTRL, a comparação de proliferação de CD4⁺ cocultivados com MSC em diferentes proporções revelou um percentual maior no C+ (células mononucleares estimuladas com *beads*) nas proporções 1:10, 1:5 e 1:2. Com relação a proliferação de CD8⁺, o grupo CTRL apresentou um percentual de proliferação maior no C⁺ em relação ao percentual apresentado por CD8⁺ com MSC nas proporções 1:2 e 1:5. Não foi observado nenhuma diferença entre os percentuais apresentados por células mononucleares cocultivados com MSC nas proporções 1:20 e 1:50 para CD4⁺, e nas proporções 1:10, 1:20 e 1:50 para CD8⁺ (Figura 6).

No grupo PV, a comparação de proliferação de CD4⁺ cocultivados com MSC em diferentes proporções revelou um percentual maior no C+ nas proporções 1:5 e 1:2. A proliferação de CD8⁺ no grupo CTRL foi maior no C⁺ em relação ao percentual de proliferação apresentado por CD8⁺ cocultivados com MSC nas proporções 1:2 e 1:5. Por sua vez, as MSC de PV cocultivadas com CD8⁺ nas proporções 1:20 e 1:50 apresentaram um percentual de proliferação maior do que o C⁺. Não foi observada nenhuma diferença entre os percentuais apresentados por células mononucleares cocultivados com MSC nas proporções 1:10, 1:20 e 1:50 para CD4⁺, e na proporção 1:10 para CD8⁺ (Figura 6).



Figura 6. Resultados da comparação do percentual de proliferação de células T CD4+ e CD8+ alogênicas cocultivadas com MSC de pacientes com PV (n=5) e doadores saudáveis (CTRL, n=3). Ensaios realizados em triplicata. Teste estatístico de Mann-Whitney. Resultados significantes quando *p*<0,05.

Nas comparações entre os grupos CTRL e PV (Tabela 10), o percentual de proliferação de CD4⁺ foi maior no grupo PV do que no grupo CTRL para a proporção 1:2 MSC/células mononucleares (p=0,0059). Nas proporções 1:10 e 1:20 e 1:50 MSC/células mononucleares o grupo CTRL exibiu a maior taxa proliferativa.

Para as células T CD8⁺ foi observado uma diferença apenas na proporção 1:5 MSC/células mononucleares, onde o grupo CTRL exibiu um percentual de proliferação maior do que o grupo PV (Figura 7 e 8).



Figura 7. Comparação entre as porcentagens da proliferação de células T CD4⁺ alogênicos cocultivados com MSC dos grupos PV (n=5) e CTRL (n=3). Ensaios realizados em triplicata Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes quando p<0,05.



Figura 8. Comparação entre as porcentagens da proliferação de células T CD8⁺ alogênicos cocultivados com MSC dos grupos PV (n=5) e CTRL (n=3). Ensaios realizados em triplicata. Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes quando p<0,0500.

		0	/				
					CTRL	PV	
Comparação		Valor de p (CTRL)	Valor de p (PV)	Valor de p (CTRL x PV)	Mediana	Mediana	
	C+				99,66	97,04	
Si	1:2	0,0022	<0,0001	0,0059	41,03	51,00	
eare	1:5	0,0022	<0,0001	0,3941	84,60	82,04	
) / cé nucl	1:10	0,0043	0,8466	0,0008	99,02	97,33	
VSC	1:20	0,2381	0,5288	<0,0001	99,52	96,82	
<u> </u>	1:50	0,1619	0,6464	0,0062	99,52	97,16	
	% proliferação CD8+						
Com	oaração	Valor de p	Valor de p	Valor de p	CTRL	PV	
Comparação		(CTRL)	(PV)	(CTRL x PV)	Mediana	Mediana	
	C+				97,23	91,60	
v	1:2	0,0022	0,0002	0,4695	38,88	42,15	
lulas eare	1:5	0,0043	0,0002	0,0415	81,35	73,94	
/ cé nucl	1:10	0,6753	0,2463	0,1357	97,57	95,98	
MSC	1:20	0,2381	0,0012	0,4541	97,85	98,01	
<u>-ε</u>	1:50	0,6753	0,0003	0,3762	97,57	98,05	

Tabela 10. Percentual de proliferação das células mononucleares alogênicas cocultivadas com MSC dos grupos CTRL (n=3) e PV (n=5).

Teste estatístico de Mann-Whitney. Foram consideradas significantes as comparações cujo valor de *p foi <0,05.* CTRL: controle; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial e MF: mielofibrose primária.

O efeito inibitório das MSC foi observado principalmente nas maiores concentrações de MSC (MSC nas proporções 1:2 e 1:5), nos dois grupos e para as células CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 9 e 10, respectivamente). O percentual de inibição foi calculado para a subpopulação CD4+ e para a CD8+, dos dois grupos, para as diferentes proporções de MSC/células mononucleares (1:2, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50) (Tabela 11), utilizando equação apresentada no item 4.8.

O percentual de inibição de proliferação de CD4⁺ foi maior no grupo CTRL quando comparado ao grupo PV, na proporção 1:2 MSC/células mononucleares. Não houve diferença na inibição nas demais proporções de MSC entre os grupos (Figura 9, Tabela 11).

Para as células T CD8+ não foram observadas diferenças no percentual de inibição entre os grupos nas diferentes proporções de MSC. A ausência de inibição de proliferação foi encontrado no grupo PV, nas proporções de MSC/PBMCs 1:20 e 1:50 nas células CD4⁺ (Figura 9), e em 1:10, :120 e 1:50 para as células CD8⁺ (Figura 10). No grupo CTRL, isso foi observado apenas para CD8+ na proporção MSC/PBMCs 1:20 (Figura 10). A ausência do efeito inibitório da MSC poderia ser devido uma proliferação maior do que a apresentada pelas células mononucleares estimuladas cultivadas sozinhas (C⁺), um indicativo que a condição de cocultivo com MSC em baixas proporções gere um estímulo extra para a proliferação de CD4⁺ CD8⁺. Contudo, não foram constatadas diferenças no percentual de inibição destes valores, tampouco no de proliferação.

Tabela 11. Quantificação do percentual de inibição de proliferação de células mononucleares alogênicos cocultivados com MSC dos grupos CTRL (n=3) e PV (n=5).

	% IIIDIÇa0 CD4*						
Proporção		CTRL	PV				
MSC/células	Valor de p	Madiana	Madiana				
mononucleares		Weuldila	Weulana				
1:2	0,0476	57,83	41,02				
1:5	>0,9999	17,42	18,44				
1:10	0,1905	0,585	1,66				
1:20	0,1905	0,095	0,056				
1:50	0,0952	0,155	0,0340				
	% in	ibição CD8+					
Proporção		CTRL	PV				
MSC/células	Valor de p	Mediana	Mediana				
mononucleares		Mediana	Mediana				
1:2	0 3000	67 <i>1</i> 6	57.00				
	0,3000	57,45	57,86				
1:5	>0,9999	20,83	19,54				
1:5 1:10	>0,9999 0,4000	20,83 0,325	19,54 1,887				
1:5 1:10 1:20	>0,3000 >0,99999 0,4000 0,4000	20,83 0,325 0,4100	19,54 1,887 0				

Teste estatístico de Mann-Whitney. Foram consideradas significantes as comparações cujo valor de *p foi <0,05.* CTRL: controle; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial e MF: mielofibrose primária.



Figura 9. Comparação entre as porcentagens da proliferação de células T CD4⁺ alogênicos cocultivados com MSC dos grupos PV (n=5) e CTRL (n=3). Ensaios realizados em triplicata. Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes quando p<0,05.



Figura 10. Comparação entre as porcentagens da proliferação de células T CD8⁺ alogênicos cocultivados com MSC dos grupos PV (n=5) e CTRL (n=3). Teste de Mann-Whitney. Não houve diferença da percentagem de inibição das células T CD8⁺ entre os grupos analisados. Ensaios realizados em triplicata. Resultados significantes quando *p* for <0,05.

5.4 Sensibilidade à estaurosporina

As curvas de dose-resposta foram realizadas para verificar a sensibilidade à estaurosporina, um indutor de apoptose, das MSC dos grupos PV (n=3) e CTRL (n=3). A partir da curva-dose resposta foi estimado o IC50 de estaurosporina para cada grupo, sendo a mediana do grupo PV de 131,65 nM e o do grupo CTRL de 128,9 nM (Figura 11).



Figura 11. Curva-dose resposta para a Estaurosporina em MSC de CTRL (n=3) e PV (n=3), utilizando diferentes concentrações seguindo escala semi-logarítmica (1/log2): 10 μ M, 3,3 μ M, 1 μ M, 0,33 μ M, 0,1 μ M, 0,033 μ M, 0,01 μ M, 0,0033 μ M, 0,001 μ M, 0,00033 μ M. Resultados expressos em percentual máximo de Unidades de Absorbância (UA) em 24 horas.

A análise de eficiência do efeito da estaurosporina revelou que o grupo PV apresentou o percentual de viabilidade maior nas concentrações de 10 µM e 1 µM quando comparado ao apresentado pelo grupo CTRL. Contudo, nas demais

concentrações, incluindo as que abrangem a IC50, observa-se tendência também de maior viabilidade celular nas MSC de pacientes com PV do que nas MSC de doadores saudáveis, um indicativo que essas células apresentam uma resistência maior a morte celular do que as pertencentes ao grupo CTRL (Tabela12).

Tabela 12. Resultados do percentual de viabilidade celular de MSC de CTRL (n=3) e PV (n=3), após tratamento por 24h com diferentes concentrações de estaurosporina.

Concentrações	CTRL	PV	Valor de p	
de	Média	Média		
estaurosporina	(Desvio padrão)	(Desvio padrão)		
10 µM	17,57	40,51	0 0008	
	(± 3,92)	(± 1,92)	0,0008	
1 µM	27,98	54,82	0.0217	
	(±5,35)	(±13,32)	0,0317	
0,33 µM	42,30	62,01	0 1170	
	(±12,38)	(±11,92)	0,1179	
0,1 µM	59,37	77,55	0 1740	
	(± 17,94)	(±6,61)	0,1749	
0,01 µM	78,30	93,34	0 1740	
	(± 15,15)	(± 4,93)	0,1749	

Teste estatístico t student. Foram consideradas significantes as comparações cujo valor de *p foi <0,05.* CTRL: controle; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial e MF: mielofibrose primária.



Figura 12. Cálculo da viabilidade celular pós tratamento com indutor de apoptose estaurosporina por 24 horas, em MSC de CTRL (n=3) e PV (n=3). Resultados expressos em percentual de viabilidade celular, pelo ensaio de MTT. Teste estatístico de t student. Resultados significantes quando p for <0,05.

5.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas no plasma de medula óssea de pacientes com PV, TE e MF, e indivíduos do grupo CTRL

Para melhor caracterizar o microambiente medular, em que as MSC se encontravam antes do isolamento, foi realizada a dosagem de citocinas, quimiocinas e proteínas relacionadas aos processos de inflamação e neoangiogênese.

Os perfis de citocinas e quimiocinas presentes no microambiente medular (plasma da MO) dos grupos CTRL (n=17), PV (n=19), TE (n=19) e MF (n=16) foram descritos (Tabela 13) e comparados.

Tabela 13. Resultados da quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores próangiogênicos no plasma de MO de doadores saudáveis (CTRL; n=17) e pacientes com PV (n=19), TE (n=19) e MF (n=16).

	CTRL	PV	TE	MF
Analito	Mediana (pg/mL)	Mediana (pg/mL)	Mediana (pg/mL)	Mediana (pg/mL)
IL-6	9,46	15,6	11,54	9,39
IL6R-α	43642	52022	48208	51576
IL-10	35,2	42,5	33,42	34
IL-1β	46,1	60,72	63,08	54,89
IL-12p70	382,3	452,4	443,7	386,4
IL-17 ^a	24,7	33,26	31,18	28,58
IL-18	191,9	343,5	256,9	375
CXCL8 (IL-8)	36,94	98,26	127,1	71,73
CXCL12 (SDF-1	0077	4000	1000	1000
α)	967,7	1093	1038	1033
CXCL10 (IP-10)	65,44	276,7	72,54	98,81
VEGF-A	397,1	599,5	505	411,2
VEGF R2/KDR	9212	11128	10390	9218
CCL2 (MCP-1)	288,9	491,9	345,9	416,1
CCL5 (RANTES)	17650	19538	19866	18892
GM-CSF	35,3	50,14	48,18	43,61
M-CSF	6116	6778	6550	6169
G-CSF	569,3	653,1	620,3	609,9
IFN-γ	1855	2164	2128	2092
TNF-α	45,79	56,28	54,3	48,52
HGF	392,7	774	458,3	363,9

CTRL: controle; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial e MF: mielofibrose primária.

A estratificação dos dados, com a mediana de idade e a distribuição de gênero entre os grupos, é apresentada no Apêndice 4.

Em relação ao grupo CTRL, os três grupos de pacientes com NMP apresentaram níveis aumentados de IL-8, IFN-γ, IL-17a, IL-18, CCL2 (MCP-1), GM-CSF e TNF-α no microambiente medular. O grupo de pacientes com PV, comparado com o grupo CTRL, apresentou níveis aumentados de VEGFA, VEGFR2, IL-6Rα, CXCL10 (IP-10), IL-1β, CCL5 (RANTES), IL-12p70, M-CSF e HGF. O grupo de pacientes com TE, comparado com o grupo CTRL, apresentou níveis aumentados de VEGFA, IL-1β, CCL5, IL-12p70 e M-SCF. O grupo de pacientes com MF comparado com o grupo CTRL apresentou níveis aumentados de IL-6Rα e CXCL10.

Na comparação do perfil de citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicas entre os grupos de NMP, os pacientes com PV apresentaram níveis aumentados de VEGFA, IL-10, IFN- γ , IL-17a, M-CSF, TNF- α e HGF em relação aos pacientes com MF, e níveis aumentados de CXCL10 e HGF em comparação com os pacientes com TE. O grupo de pacientes com TE apresentou níveis aumentados de VEGFA e CCL5 comparado ao grupo MF (Figuras 13-15).

A concentração de CCL5 foi maior no grupo de PV em relação ao grupo de MF, mas a análise estatística indicou apenas uma tendência a significância (p=0,0503). Os níveis medulares de IL-6, CXCL12 (SDF-1α) e G-CSF foram similares entres os grupos controle e de pacientes com NMP (Figura 15).



Figura 13. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos na medula óssea de pacientes com PV, TE e MF e CTRL. Foram dosados: VEGFA, VEGFR2, IL-6, IL-6R α , IL-8, IL-10, IL-1 β e IL-17a. CTRL: Controles (n=17); PV: policitemia vera (n=19); TE: trombocitemia essencial (n=19) e MF: mielofibrose primária (n=16). Teste estatístico de Mann-Whitney. Resultados significantes quando *p* for <0,05.



Figura 14. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos na medula óssea de pacientes com NMP (PV, TE e MF) e CTRL. Foram dosados: IL-12p70, IL-18, CXCL10, CXCL12, GM-CSF e HGF. CTRL: Controles (n=17); PV: policitemia vera (n=19); TE: trombocitemia essencial (n=19) e MF: mielofibrose primária (n=16). Teste estatístico de Mann-Whitney. Resultados significantes quando *p for <*0,05.



Figura 15. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos na medula óssea de pacientes com NMP (PV, TE e MF) e CTRL. Foram dosados: M-CSF, G-CSF, CCL2, CCL5, IFN- γ e TNF- α . CTRL: Controles (n=17); PV: policitemia vera (n=19); TE: trombocitemia essencial (n=19) e MF: mielofibrose primária (n=16). Teste estatístico de Mann-Whitney.

Para comparar a força da correlação apresentada entre as citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos dentro de um mesmo grupo foi realizado o teste de Spearman. As correlações entre as citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos, nos diferentes grupos avaliados, foram analisados e apresentados em diagramas preparados com auxílio do *software* Cytoscape. Sendo assim, foram criadas imagens da rede de interação presente em grupo estudado (controle e dos pacientes com PV, TE e MF).

A espessura das linhas indica a grandeza da correlação, levando em consideração o valor de r gerado pelo teste estatístico. Quanto mais espessa for a linha maior valor de r. São consideradas correlações negativas àquelas cujos valores de r forem <0, fracas quando r for $\leq 0,35$, moderadas quando o r estiver entre 0,36 e 0,67 (0,36 \geq r \leq 0,67) e fortes quando r for \geq 0,68.

O grupo controle apresentou várias conexões fortes entre as citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos, as quais envolveram VEGFR2, VEGFA, IL-10, IFN- γ , CCL5, M-CSF, IL-12p70, TNF- α e IL-1 β . Foram detectadas também, neste grupo, correlações moderadas entre as citocinas, quimiocinas e fatores proangiogênicos, com exceção do CCL2, que não exibiu correlação com os demais analitos analisados (Figura 16). Não foram observadas correlações negativas ou fracas no grupo controle.



Figura 16. Rede das interações entre as citocinas, quimiocinas e fatores proangiogênicos da medula óssea do grupo controle (CTRL). As correlações foram calculadas pelo teste de Spearman, e a força da correlação determinada pelo valor de r. O grupo controle apresentou muitas correlações moderadas (linhas finas; 0,36 \ge r \le 0,67) e algumas fortes (linhas grossas, r \ge 0,68). A quimiocina CCL2 não exibiu correlação com os demais analitos (destaque em vermelho).

O grupo de pacientes com PV exibiu um número de correlações entre as citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos similar ao grupo CTRL. Foram observadas interações fortes entre VEGFR2, IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, IL-13, IFN-γ, IL-1β, IL-12p70, GM-CSF, M-CSF e CCL5. As interações moderadas representaram a maioria das interações apresentadas por esse grupo (Figura 17). Não houve correlações negativas e fracas.

Comparando PV com o grupo CTRL, houve um aumento da força de interação, de moderada para forte, nas interações entre IL-10 e IL-1β, IL-1β e IL-12p70, IFN-γ e M-CSF, CCL5 e M-CSF. As interações entre IFN-γ e CCL5 mantiveram-se fortes e novas interações fortes foi observada entre IL-6 e IL-8/IL-12p70, CCL2, IL-8 e CCL2,

IL-10 e GM-CSF. Foi observada perda de interações no grupo de pacientes com PV, que se apresentam fortes no grupo CTRL, como relações entre VEGFR2 e VEGFA, IL-10 e IFN- γ /M-CSF/IL-12p70, VEGFA e TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , IFN- γ e IL-17a/IL-12p70, CCL5 e IL-17a. A diminuição da força de interação, de forte para moderada, apresentada nas interações entre IL-10 e CCL5, IL-1 β e IL-17a, CCL5 e IL-12p70, foi observada quando comparado com o grupo CTRL.



Figura 17. Rede das interações entre as citocinas, quimiocinas e fatores proangiogênicos da medula óssea do grupo de policitemia Vera (PV). As correlações foram calculadas pelo teste de Spearman, e a força da correlação determinadas pelo valor de r. O grupo policitemia vera apresentou muitas correlações moderadas (linhas finas; $0,36 \ge r \le 0,67$) e algumas fortes (linhas grossas, r $\ge 0,68$).

O grupo de pacientes com TE foi o que mais exibiu correlações entre as citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos da medula óssea (Figura 18). Esse

grupo exibiu mais interações fortes que os demais, entre IL-6, IL-8, IL-1β, CCL2, IL-10, IFN-γ, IL-17a, M-CSF, G-CSF e IL-12p70. A correlação negativa entre IL-8 e IL-6Rα foi também encontrada. Os analitos VEGFR2 e HGF não exibiram correlação com nenhum dos outros analitos avaliados. Não foi encontrada correlação fraca entre as citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos da medula óssea neste grupo.

Comparando-se o grupo de pacientes com TE e o grupo CTRL, verifica-se o aumento da força de interação, de moderada para forte, nas interações entre IL-10 e IL-1 β , IFN- γ e M-CSF, IL-17a e M-CSF/G-CSF/IL-12p70. As interações entre IFN- γ e IL-17a mantiveram-se fortes, e novas interações fortes foram observadas entre IL-6 e IL-8/IL-1 β /CCL2, IL-1 β e CCL2, IFN- γ e G-CSF, M-CSF e G-CSF, G-CSF e II-12p70.

Foi observada a perda de interações que se apresentaram fortes no grupo CTRL entre VEGFR2 e VEGFA, IL-10 e CCL5. O grupo TE foi o que mais exibiu diminuição da força de interação, de forte para moderada, quando comparado com o grupo CTRL, nas interações entre IL-10 e IFN- γ /M-CSF/IL-12p70, VEGFA e TNF- α , IL-1 β e IFN- γ /IL-17a, IFN- γ e CCL5, CCL5 e IL-17a/IL-12p70.



Figura 18. Rede das interações entre as citocinas, quimiocinas e fatores proangiogênicos da medula óssea do grupo de pacientes com trombocitemia essencial (TE). As correlações foram calculadas pelo teste de Spearman, e a força da correlação determinadas pelo valor de r. O grupo trombocitemia essencial apresentou muitas correlações moderadas (linhas finas; $0,36 \ge r \le 0,67$) e fortes (linhas grossas, $r \ge 0,68$), e uma negativa (linha tracejada, r<0). HGF e VEGFR2 não exibiram correlação com os demais analitos analisados (destaque em vermelho).

O grupo de pacientes com MF foi o que exibiu perfil diferente de PV, TE e CTRL (Figura 19), com destaque para a diminuição do número de correlações moderadas. Foram observadas interações fortes entre VEGFR2, M-CSF, IL-6, IL-8, CXCL10, IL-10, VEGFA, HGF, IFN-γ, CCL5, IL-17a, GM-CSF, G-CSF, IL-18 e IL-12p70. Não foram detectadas correlações negativas e fracas neste grupo.

Comparando o grupo de pacientes com MF e o grupo CTRL, verifica-se aumento da força de interação, de moderada para forte, nas interações entre VEGFA e HGF, IL-17a e GM-CSF. As interações entre IFN-γ e CCL5 mantiveram-se, e novas interações fortes foram observadas entre VEGFR2 e M-CSF, IL-6 e IL-8, CXCL10 e

IL-10, G-CSF e IL-18 e IL-12p70 e HGF. Foi observada a perda de interações que se apresentam fortes no grupo CTRL entre VEGFR2 e VEGFA, IL-10 e IFN- γ /CCL5/M-CSF/II-12p70, VEGFA e TNF- α , IL-1 β e IL-17a, IFN- γ e IL-12p70, CCL5 e II-12p70. A diminuição da força de interação, de forte para moderada, quando comparado com o grupo CTRL, foi observada entre IL-1 β e IFN- γ , IFN- γ e IL-17a,CCL5 e IL-17a.



Figura 19. Rede das interações entre as citocinas, quimiocinas e fatores proangiogênicos da medula óssea do grupo de pacientes com mielofibrose (MF). As correlações foram calculadas pelo teste de Spearman, e a força da correlação determinadas pelo valor de r. O grupo mielofibrose primária apresentou o menor número de correlações, sendo elas moderadas (linhas finas; 0,36 ≥ r ≤ 0,67) ou fortes (linhas grossas, r≥ 0,68).

Buscando compreender ainda mais as características de cada grupo, uma análise categórica foi realizada. A análise categórica realiza o agrupamento das amostras em alto ou baixo produtores para cada uma das citocinas, quimiocinas e fatores inflamatórios e pro-angiogênicos estudados. Isso foi possível por meio do cálculo da média da concentração dos analitos, levando em consideração os valores detectados de todas as amostras analisadas. Uma vez calculada, essa média global foi usada como ponto de corte para a classificação entre alto (concentração individual acima da média global) e baixo (concentração individual abaixo da média global) produtor. Os resultados da categorização foram compilados em diagramas de preto e branco, no qual os altos produtores foram preenchidos com a cor preta.

O grupo CTRL é o composto por baixos produtores para as citocinas e quimiocinas estudas nos quatro grupos, com frequência inferior a 50% para todos os analitos (IL-6, IL-6R α , IL-8, IL-10, IL-17 α , IL-12 ρ 70, IL-18, IL-1 β , CCI2, CCL5, VEGFA, VEGFR2, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF e HGF) (Figura 20).



Figura 20. Análise de categorização das citocinas, quimiocinas e fatores próangiogênicas do plasma de medula óssea do grupo CTRL. Quadros em preto representam alto produtores para o analito e os branco os baixos produtores. Cada coluna representa um analito diferente, e cada linha representa os padrões de produção de um único indivíduo. O percentual da frequência de alto produtores em cada grupo encontra-se ao final de cada coluna.

O grupo PV apresenta um perfil distinto dentre os outros grupos de NMP, exibindo uma frequência elevada de altos produtores, para todos os analitos estudados (IL-6, IL-6R α , IL-8, IL-10, IL-17a, IL-12p70, IL-18, IL-1 β , CCI2, CCL5, VEGFA, VEGFR2, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF e HGF) (Figura 21).



Figura 21. Análise de categorização das citocinas, quimiocinas e fatores pró-angiogênicas do plasma de medula óssea do grupo PV. Quadros em preto representam alto produtores para o analito e os branco os baixos produtores. Quadros em amarelo indicam os mediadores que apresentam uma frequência de altos produtores maior que 50% dos indivíduos analisados. Cada coluna representa um analito diferente, e cada linha representa os padrões de produção de um único indivíduo. O percentual da frequência de alto produtores em cada grupo encontra-se ao final de cada coluna.

O grupo TE apresenta frequência elevada de alto produtores de IL-6, IL-8, IL-17a, IL-12p70, IL-1β, CCL2, CCL5, VEGFA, VEGFR2, TNF-α, IFN-γ, GM-CS. M-CSF e HGF. A frequência maior observada é de alto produtores (Figura 22).



Figura 22. Análise de categorização das citocinas, quimiocinas e fatores próangiogênicas do plasma de medula óssea do grupo TE. Quadros em preto representam alto produtores para o analito e os branco os baixos produtores. Quadros em amarelo indicam os mediadores que apresentam uma frequência de altos produtores maior que 50% dos indivíduos analisados. Cada coluna representa um analito diferente, e cada linha representa os padrões de produção de um único indivíduo. O percentual da frequência de alto produtores em cada grupo encontra-se ao final de cada coluna, estando em negrito os valores maiores que 50%.

O grupo MF é o que exibe a menor frequência de alto produtores de citocinas e quimiocinas entre as NMP, sendo observado em apenas 8 dos 20 analitos estudados, sendo eles IL-6Rα, IL-8, IL-18, IL-1β, CXCL12, CXCL10, CCL2 e GM-CSF (Figura 23).



31,25 **69,75** 50,00 37,50 37,50 43,75 **75,00** 50,00 50,00 **69,75 56,25** 25,00 43,75 31,25 37,50 37,50 50,00 43,75 43,75 43,75

Figura 23. Análise de categorização das citocinas, quimiocinas e fatores próangiogênicas do plasma de medula óssea do grupo MF. Quadros em preto representam alto produtores para o analito e os branco os baixos produtores. Cada coluna representa um analito diferente, e cada linha representa os padrões de produção de um único indivíduo. O percentual da frequência de alto produtores em cada grupo encontra-se ao final de cada coluna.

A representação por gráficos de radar também demonstra o perfil característico exibido por cada grupo, sendo PV o com maior frequência de altos produtores para citocinas, quimiocinas e fatores pró-angiogênicas, seguido de TE, MF e por último o grupo CTRL, no qual a frequência de baixo produtores de citocinas e quimiocinas é a predominante (Figura 24).



Figura 24. Representação do perfil imunológico dos grupos CTRL, PV, TE e MF. Os gráficos em radar resumem o percentual de altos produtores para cada analito avaliado.

5.6 Expressão de genes e microRNAs em MSC

A expressão de genes relacionados a importantes reguladores da apoptose (*BAK1, MCL1, BIRC2* e *BCL2*) foi avaliada em MSC dos grupos PV, TE, MF e CTRL (Figura 25). O grupo PV apresentou uma maior expressão do gene *BIRC2*, comparado ao grupo CTRL. Embora nenhuma outra diferença estatística tenha sido encontrada, observa-se na comparação com o grupo CTRL uma tendência de elevação dos genes anti-apoptóticos: *BIRC2* nos grupos de NMP e *MCL1* em MF. O gene pró-apoptótico *BAK1* apresentou uma tendência de elevação em MF comparado aos demais grupos. Os valores de mediana e de p encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Valores das medianas e do p obtido nas análises comparativas dos níveis de expressão de genes relacionados a regulação da apoptose em MSC de PV, TE, MF e CTRL.

	Genes					
	MCL1	BCL2	BAK1	BIRC2		
Comparações						
CTRL x PV	0,3745	0,2238	0,3745	0,0476		
CTRL x TE	0,4008	0,1238	0,4372	0,1775		
CTRL x MF	0,2857	0,2000	0,1250	0,1964		
PV x TE	>0,999	0,1937	0,3939	0,5152		
PV x MF	0,4524	0,4524	0,3571	0,4286		
TE x MF	0,4286	0,3810	0,2738	0,4762		
Medianas	Medianas					
CTRL	276,6	0,26	110,2	1,2		
PV	274,6	0,31	112,1	2,23		
TE	212,2	0,34	98,72	4,14		
MF	381,8	0,59	197,6	2,31		

Teste estatístico de Mann-Whitney. Foram consideradas significantes as comparações cujo valor de *p foi <0,05.* CTRL: controle; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial e MF: mielofibrose primária.



Figura 25. Quantificação de genes regulatórios da apoptose em MSC de pacientes PV (n=6), TE (n=6) e MF (n=3), e indivíduos saudáveis (CTRL, n=5), por SYBR[®] Green. Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Endógenos utilizados foram *ACTB* e *B2M*. Teste de Mann-Whitney.

Uma vez que nosso grupo já relatou a desregulação de alguns microRNAs envolvidos na apoptose (apoptomiRs) nas NMP (NUNES et al., 2013; TOGNON et al., 2011, 2012), a potencial desregulação em MSC foi pesquisada. Assim sendo, foi realizada a pesquisa dos apoptomiRs MIR15A, MIR16-2, MIR29C, MIR21 e MIR130B (Figura 26). O grupo de pacientes com PV apresentou a expressão elevada de MIR15A e MIR16-2 na comparação com o grupo controle.

O grupo TE apresentou expressão elevada de MIR21 comparado com grupo PV. Os valores de mediana e p foram exibidos na tabela 15.

Tabela 15. Resultados das análises comparativas dos níveis de expressão de apoptomiRs em MSC de PV, TE, MF e CTRL.

	microRNAs					
	MIR15A	MIR16-2	MIR29C	MIR21	MIR130B	
Comparações						
CTRL x PV	0,0286	0,0286	0,3005	0,4212	0,2659	
CTRL x TE		>0,9999	0,3005	0,1238		
CTRL x MF	0,1000	0,1000	0,5000	0,4286	0,4286	
PV x TE		0,0667	0,3447	0,0350		
PV x MF	0,4000	0,1333	0,2833	0,4333	0,3333	
TE x MF		0,3333	0,2833	0,1190		
Medianas						
CTRL	76,39	8038	3161	53584	143,7	
PV	226,9	18218	3500	45095	274,3	
TE		7307	3746	91331		
MF	238,4	13502	2450	56965	256,4	

Teste estatístico de Mann-Whitney. Foram consideradas significantes as comparações cujo valor de *p foi <0,05* (em negrito). CTRL: controle; PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial e MF: mielofibrose primária. Em negrito o valor de p<0,005.


Figura 26. Quantificação de apoptomiRs em MSC de pacientes PV (n=7), TE (n=7) e MF (n=3), e indivíduos saudáveis (CTRL, n=5), por TaqMan[®]. Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Endógenos utilizados foram RNU24 e RNU48. Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes quando *p for* <0,05.

Análises de predição para os alvos destes microRNAs foram realizadas utilizando a base de data miRWalk2.0 (DWEEP; GRETZ, 2015), dando o enfoque em genes relacionados com a apoptose, inflamação e angiogênese. O resultado desta predição pode ser visualizado na Tabela 16.

microRNAs	Genes alvo predito		
	Apoptose	Inflamação e angiogênese	
MIR15A	BCL2L2, BIK, BCL2, BCL2L11, BIRC5 CASP1	IL8BP, IL17RB, TNFAIP3,	
		TNFRSF11A, IFNGR2, HGF,	
		IL6R, e TGFBR2	
MIR16-2	BCL2, BID e BIK	IL10RA, IL20, IL2RA,	
		TGFBR3, IFNAR1, IL7R,	
		TNFAIP1, TNFRSF25, CXCR5	
		e VEGFA	
MIR21	BCL2, BIRC3 e FASLG	IL6R, IL6ST, IL12A, IL1RAP,	
		CCL22, CCL1, CCL20,	
		CXCR5, TNFRSF11B,	
		TNFAIP3, TGFB2, TGFBI,	
		TGFBR1 e TGFBR3	
MIR29C	BAK1, BCL2, CASP8 e MCL1	TGFB2, IL5RA, IL17RD,	
		IL1RAP, IL1RL1, IL24,	
		HIF3A, TNFRSF1A, VEGFA,	
		CXCL12	
MIR130B	BCL2L11 (BIM), CASP6, BIRC3, CFLAR,	IL17RD, IL23R, CSF1,	
		IL1RAP, IL6ST, IL15, IL17RA,	
		IFNLR1, TNF, TNFSF15,	
		TNFS8, TGFA, TGFB2 e	
		TGFBR1	

Tabela 16. Resultados da análise de predição utilizando a base de dados miRWalk2.0.Interações de microRNAs-gene alvo.

O microambiente medular de pacientes com NMP, que foram analisados, apresentou elevados níveis de citocinas e quimiocinas relacionadas com inflamação e angiogênese. A MSC é um membro importante do nicho e apresentam desregulação em microRNAs que se relacionam a estes processos, fizemos a quantificação dos genes *IL6, CXCL8* (IL-8), *VEGFA, IL10* e *TNF* em MSC do grupo PV e CTRL. A escolha desses grupos foi devido à maior homogeneidade dos aspectos clínicos apresentadas pelos pacientes que compõe o grupo PV, e porque o microambiente na

PV foi o que apresentou um perfil mais alterado quanto a presença de citocinas, quimiocinas e fatores pró-angiogênicas.

A comparação entre os níveis de expressão dos genes entre os grupos PV e CTRL (Tabela 17) revelou a elevação nos níveis do gene *IL6* no grupo PV comparado com o grupo CTRL e de *TNF* no grupo CTRL comparado ao grupo PV. Foi observado uma tendência na diminuição dos níveis do gene *CXCL8* e elevação do gene *VEGF,* na comparação entre o grupo PV com grupo CTRL (Figura 27).

Tabela 17. Comparação dos níveis dos genes relacionados com a inflamação e angiogênese em pacientes PV (n=8) e CTRL (n=5).

	CTRL	PV	Correlação
GENES	Mediana	Mediana	Valor de p (PV x CTRL)
IL6	98,14	276,9	0,0366
CXCL8	31,23	29,27	0,0637
VEGF	1066	3032	0,0628
TNF	37,96	33,63	0,0317
IL10	0,11	0,07	0,3413



Figura 27. Quantificação de genes relacionados com inflamação e angiogênese em MSC de pacientes PV (n=8) e indivíduos saudáveis (CTRL, n=5), por TaqMan[®]. Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Endógeno utilizado foi o gene *GAPDH*. Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes quando *p* for <0,05.

Para analisarmos a correlação da expressão de microRNAs com seus genes preditos, foram realizadas análises de correlação de Spearman, nos grupos em que o n>3 para a expressão de genes e microRNAs.

Para o MIR15A foram feitas as correlações com os genes *BCL2* e *IL6*, nos grupos CTRL e de pacientes com PV. Contudo, não foi observada nenhuma correlação entre esses genes e o MIR15A nos grupos estudados (Figura 28).

A correlação positiva entre o MIR16-2 e o gene *VGFA*, foi encontrada no grupo CTRL (p=0,0167; r²=0,7452). O grupo de paciente com PV não apresentou tal correlação. Não foi encontrada correlações entre o MIR16-2 e os genes *IL6* e *BCL2*, nos grupos estudados (Figura 29).

Para o MIR21 foram analisadas as correlações com os genes *BCL2* e *IL6*, nos grupos de pacientes com PV e doadores saudáveis (CTRL). Não foi encontrada correlações entre o MIR21 e os genes *BCL2* e *IL6*, nos grupos estudados (Figura 30).

Para o MIR29C foram analisadas as correlações com os genes *BCL2*, *BAK1*, *MCL1*, *IL6* e *VEGFA*. Não foi encontrada correlação do MIR29c com nenhum dos genes nos grupos estudados (Figura 31).

Para o MIR130B foram analisados a correlação com o gene *TNF*, no grupo de pacientes com PV e no grupo CTRL. Não foi observada nenhuma correlação do MIR130B nos grupos estudados (Figura 32).



Figura 28. Resultado das análises de correlação entre a expressão do MIR15A com os genes preditos *BCL2* e *IL6*, nos grupos de pacientes com PV e doadores saudáveis (CTRL). Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Teste de correlação de Spearman. Resultados significantes quando *p for* <0,05.



Figura 29. Resultado das análises de correlação entre a expressão do MIR16-2 com os genes preditos *BCL2, VEGFA* e *IL6*, nos grupos de pacientes com PV e doadores saudáveis (CTRL). Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Teste de correlação de Spearman. Resultados significantes quando *p* for <0,05.



Figura 30. Resultado das análises de correlação entre a expressão do MIR21 com os genes preditos *BCL2* e *IL6*, nos grupos de pacientes com NMP e doadores saudáveis (CTRL). Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Teste de correlação de Spearman. Resultados significantes quando *p for* <0,05.



Figura 31. Resultado das análises de correlação entre a expressão do MIR29C com os genes preditos *MCL1*, *BAK1*, *BCL2* e *VEGFA*, nos grupos de pacientes com NMP e doadores saudáveis (CTRL). Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Teste de correlação de Spearman. Resultados significantes quando *p for* <0,05.



Figura 32. Resultado das análises de correlação entre a expressão do MIR130B com o gene predito *TNF*, nos grupos de pacientes com PV e doadores saudáveis (CTRL). Resultados são expressos em URE (unidades relativas de expressão). Teste de correlação de Spearman. Resultados significantes quando *p for* <0,05.

5.7 Caracterização de vesículas extracelulares derivadas de MSC de pacientes com PV e de doadores saudáveis (CTRL)

Para compreender o envolvimento da sinalização por vesículas extracelulares derivadas de MSC no contexto das NMP, as vesículas foram isoladas do sobrenadante de cultura de células de MSC de pacientes com PV (n=5) e do grupo CTRL (n=5). A escolha pelo grupo de pacientes PV foi devido a maior homogeneidade das características clínicas e moleculares apresentada por este grupo, além de termos uma maior taxa de eficiências no isolamento e manipulação de MSC que foram isoladas de pacientes com PV e do grupo CTRL.

O tamanho médio das vesículas extracelulares do grupo CTRL foi 172,4nm (±16,73), sendo um maior número de partículas com 138,82nm. O grupo PV por sua vez apresentou um tamanho médio de 172,9nm (± 23,82) (Figura 33). Não houve diferença na comparação dos tamanhos das vesículas extracelulares entre os grupos analisados.

A concentração média presente nas amostras enriquecidas de vesículas extracelulares derivadas de MSC de pacientes com PV foi de 5,88x10¹⁰ partículas/mL, e a do grupo CTRL foi de 7,59 x 10¹⁰ partículas/mL. Não foi observado diferença na comparação das concentrações entre os grupos analisados.



Figura 33. Quantificação e caracterização de tamanho de vesículas extracelulares derivadas de MSC dos grupos CTRL (n=5) e PV (n=5), pelo aparelho NTA (Malvern). Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes quando *p for* <0,05.

Após a caracterização, fizemos análises do conteúdo presente nestas vesículas. Duas abordagens foram escolhidas, pesquisar a presença de genes

envolvidos na inflamação e angiogênese (*IL6, CXCL8, VEGFA, TNF, IL10* e *IFNG*), e microRNAs relacionados (MIR199B, MIR132 e MIR126). A escolha destes genes e microRNAs baseou-se em relatos prévios na literatura de sua presença em vesículas extracelulares de MSC ou de células neoplásicas hematológicas.

Análises qualitativas revelaram a presença de mRNA (RNA mensageiro) para os genes *IL6*, *CXCL8* e *VEGFA* presentes em vesículas extracelulares derivadas de MSC dos grupos PV (n=4) e CTRL (n=3) (Figura 34). Contudo, não foi possível a quantificação uma vez que *GAPDH* e *ACTB* não foram detectados nas amostras (55 ciclos). Os genes *IFNG*, *IL10* e *TNF* não foram detectados nas amostras (55 ciclos)



Figura 34. Análises qualitativas relevaram a presença de microRNAs dos genes *IL6, CXCL8* e *VEGFA* em vesículas extracelulares derivadas de MSC do grupo CTRI (n=3) e PV (n=4). Ensaios de RT-PCR utilizando sondas TaqMan. Resultados expressos em CT em Log10. Resultados significantes quando *p for* <0,05.

As análises qualitativas nas vesículas extracelulares de pacientes com PV e do grupo CTRL indicaram a presença de MIR126 em todas as amostras, e em um CT considerado baixo para as análises de microRNAs presentes em vesículas extracelulares (mediana do CT igual a 31,52 para o grupo CTRL e de 32,13 para o

grupo PV). Uma vez que o endógeno comumente utilizado, RNU6b, não foi detectado em todas amostras (em 55 ciclos), escolhemos o MIR126 como o endógeno, sendo esse microRNA utilizado para a normalização e cálculo das unidades relativas de expressão destes experimentos.

O MIR199 foi detectado apenas em uma amostra pertencente ao grupo de pacientes com PV (*URE*=310,65).

O MIR132 foi detectado em 2 amostras do grupo CTRL (mediana *URE*= 817,6) e 3 do grupo de pacientes com PV (mediana *URE*=686,5) (Figura 35). Contudo não foi observada diferença na comparação entre os grupos.



Figura 35. Análise quantitativa da expressão de MIR132 presente em vesículas extracelulares derivadas de MSC de pacientes com PV (n=3) e de doadores saudáveis (n=2). Ensaios de RT-PCR utilizando sondas TaqMan, 55 ciclos. Resultados expressos em *URE* (unidades relativas de expressão), endógeno utilizado MIR126. Teste de Mann-Whitney. Resultados significantes quando *p for* <0,05.



П

As neoplasias mieloproliferativas, em especial as clássicas conhecidas também como Ph⁻, policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária, são desordens clonais da CTH clinicamente bem definidas e caracterizadas, desde meados dos anos 50. Todavia, os principais conhecimentos, sobre a fisiopatologia dessas doenças, são recentes e estão associados às alterações moleculares que participam da aquisição do fenótipo mieloproliferativo, as mutações iniciadoras (*driver mutation*) nos genes *JAK*, *CALR* e *MPL* (NANGALIA; GREEN, 2017).

Atualmente, sabe-se que a patogênese das NMP não se restringe a presença dessas mutações, pois há pacientes com TE e MF triplo negativos para as mutações iniciadoras, que apresentam pior prognósticos (RUMI; CAZZOLA, 2017).

O presente trabalho explorou e descreveu alterações do microambiente medular que provavelmente participam da patogênese das NMP.

A literatura destaca que modificações no nicho hematopoético são necessárias para o suporte e proteção das células neoplásicas. Estas alterações proporcionam um ambiente pró-tumoral favorecendo o estabelecimento e progressão de neoplasias hematológicas (KAUSHANSKY; ZHAN, 2019; MEDYOUF, 2017).

As MSC, importante componente do microambiente medular, regulam não apenas a CTH, mas diversos outros elementos celulares residentes que estão associados ao processo de tumorigênese e transformação maligna do nicho hematopoético. As MSC podem contribuir para o escape da resposta imune, por meio de sua atividade parácrina que beneficia o crescimento e sobrevida da célula neoplásica e ativação da angiogênese (MEDYOUF, 2017; RAMAKRISHNAN; JOACHIM DEEG, 2009; TAKAM KAMGA et al., 2016).

A caracterização de MSC isoladas de pacientes com PV, TE, e MF, realizada neste trabalho, revelou que estas células exibem morfologia fibroblastóide e propriedades como a capacidade de aderência ao plástico, de se diferenciar em osteócitos e adipócitos, de expressar os antígenos de superfície CD90, CD105 e CD73, e não os CD34, CD31, CD45, CD14 e HLA-DR.

Embora as MSC isoladas dos grupos das NMP não tenham apresentado perfil imunofenotípico discrepante das MSC do grupo controle (CTRL), na comparação entre as diferentes categorias nosológicas (PV, TE e MF), foram encontrados distintos percentuais de expressão dos antígenos CD90, CD54, CD105 e CD13. O grupo de pacientes com TE exibiu um percentual menor destes marcadores na comparação com o grupo de pacientes com PV. Em pacientes com MF foi observada a tendência de redução da expressão dos antígenos CD90 e CD105 em relação aos pacientes com PV, e do antígeno CD13 em relação ao grupo de pacientes com TE.

O antígeno CD13 (aminopeptidase N) apresenta funções pleiotrópicas nas MSC, incluindo mediar sinais efetores de vias de sinalização envolvidas com a regulação dos processos de adesão, proliferação e motilidade celular. Nas MSC, a expressão desse antígeno foi associada à promoção de angiogênese e quando elevada parece promover a adesão celular ao endotélio (RAHMAN et al., 2014). Esse antígeno, contudo, possui baixa especificidade para as MSC, sendo bastante expresso em células mieloides, fibroblastos e periócitos (SAMSONRAJ et al., 2017).

O antígeno CD105 (endoglina) é uma importante molécula no processo de diferenciação adipogênica e osteogênica. O CD105 atua como coreceptor para a citocina TGF-β (DOMINICI et al., 2006) e a sua depleção em MSC foi associada ao aumento do potencial osteogênico (LEVI et al., 2011). CD90 (Thy-1) está presente em células T, CTH, células endoteliais, neurônios, fibroblastos e nas MSC (MALEKI et al., 2014). Contudo a sua função nas MSC ainda não foi bem estabelecida. Moraes e colaboradores (2016) descreverem que a redução de CD90 está relacionada ao aumento da diferenciação celular osteogênica e adipogênica mas o mecanismo por trás desse efeito ainda não foi elucidado (MORAES et al., 2016).

Avanzine e colaboradores (2014) não relataram diferença significante na expressão destes marcadores de superfície em MSC de NMP (AVANZINI et al., 2014). Em contraste, o trabalho de Ramos e colaboradores (2017), demonstrou a diminuição da expressão de CD105 no grupo de NMP, mas elevada expressão de CD90, CD44 e CD73 (RAMOS et al., 2017) em relação ao grupo controle. Importante ressaltar que nos dois trabalhos supracitados não houve a separação entre as categorias de doenças, tendo sido analisadas PV, TE e MF como grupo único de NMP.

Em outras neoplasias hematológicas, como na LMA, na leucemia linfocítica aguda e em linfomas, não foi observada diferença na caracterização imunofenotípica das MSC de medula óssea em relação às MSC de indivíduos saudáveis (ZHAO et al., 2007).

A avaliação do multipotencial das MSC das amostras de medula óssea de NMP analisadas indicou que o potencial de se diferenciar em adipócitos e osteócitos está mantido e que não há diferenças entre os grupos de pacientes com PV, TE, MF e CTRL. A adipogênese e a osteogênese das MSC ocorreram com eficácia similar, significando que as MSC de pacientes com NMP possuem multipotencial de diferenciação celular semelhante as MSC medulares normais.

Os resultados da literatura quanto à multipotencialidade das MSC em NMP são controversos. Ramos e colaboradores (2017) não encontraram diferença na diferenciação celular para osteócitos e adipócitos exibidas pelas MSC de PV e TE. Contudo, Avanzine e colaboradores (2014) relataram menor índice de diferenciação das MSC em osteócitos nas NMP. Já Martinaud e colaboradores (2015) demonstraram a elevação do potencial de diferenciação osteogênica em MSC de pacientes com MF, devido à elevação de TGF-β1 e BMP-2 (do inglês *bone morphogenetic protein 2*), com aumento da via sinalizadora de *TGFB1*. No entanto, o mecanismos fisiopatogênico por trás dessa regulação ainda não foi elucidado (MARTINAUD et al., 2015).

As MSC apresentaram alteração na cinética de crescimento. pois expandiramse mais lentamente *in vitro* quando comparadas às MSC dos controles, especialmente as MSC de pacientes com MF. Isso pode ser um indicativo que o microambiente medular/célula neoplásica condiciona essas células gerando estímulos importantes para a sua proliferação, que foram perdidos com o processo de expansão *in vitro*. Tais resultados também nos ajudam a entender a baixa eficiência no estabelecimento e manutenção de cultura de MSC de pacientes com TE e MF, uma vez que a ausência dos estímulos do nicho, essa célula *in vitro*, não consegue expandir o suficiente.

Os resultados da literatura quanto à multipotencialidade das MSC em NMP são controversos. Zhao e colaboradores (2007) relataram que as MSC de NMP, leucemias agudas e linfomas não proliferam mais lentamente. Tanto Martinaud e colaboradores (2015) quanto Ramos e colaboradores (2017) não encontraram diferenças na proliferação ao avaliarem o doubling time (DT) das MSC durante passagens, em análises de ciclo celular e senescência. Por outro lado, Avanzine e colaboradores reportaram que MSC isoladas de pacientes com MF apresentam potencial proliferativo menor e expansão lenta, atingindo a senescência precocemente, e que isso poderia ser associada a um fenótipo menos multipotente das MSC (AVANZINI et al., 2014).

As propriedades imunomodulatórias das MSC foram descritas por numerosos autores e este conhecimento tem sido explorado principalmente nas estratégias de terapia celular que visam à supressão ou redução da resposta imune (BERNARDO; FIBBE, 2013; JONES et al., 2007; KIM; KIM; CHO, 2013; NAUTA et al., 2006; TYNDALL; GRATWOHL, 2009).

As MSC inibem a proliferação e reposta de diferentes subtipos de células da resposta imunes, como células dendríticas, natural killer (NK), e especialmente os linfócitos T (BERNARDO; FIBBE, 2013). O cocultivo de células MSC com células mononucleares do sangue periférico pré-ativadas parece induzir a diferenciação de células T CD4⁺ em células T reguladoras (Treg). Este processo é dependente do contato célula-célula, da presença de monócitos, e da secreção de PGE₂ e TGF-β pelas MSC (ENGLISH et al., 2009). O processo de inibição das células T CD8 ativadas pelas MSC ainda não foi bem estabelecido, mas parece ser dependente das interações célula-célula e da secreção de IDO, PGE₂ e TGF-β pelas MSC (LI et al., 2014).

Em nosso trabalho, as MSC isoladas de doadores saudáveis (grupo CTRL) inibiram a proliferação de células T CD4⁺ e CD8 pré-ativadas com CD3/CD28 ⁺ de modo dose-dependente, ou seja, quanto maior número de MSC menor proliferação e maior inibição de células mononucleares. As MSC isoladas de pacientes com PV também inibiram a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺. Interessante observar que as células T CD4⁺ e CD8⁺, quando cultivadas com as MSC de PV, nas proporções 1:20 e 1:50, ou seja, na presença de menor proporção de mesenquimais, exibiram proliferação maior do que as células mononucleares cultivados somente com o estímulo das beads. Este resultado sugere que as MSC de pacientes com PV conferem estímulo adicional para as células proliferarem.

A inibição da proliferação das células T exercida pelas MSC de PV e CTRL foi diferente somente quando as variáveis foram: células T CD4⁺ na proporção de uma célula mesenquimal para duas de células mononucleares (1:2). A diminuição da capacidade antiproliferativa de MSC de pacientes PV em células CD4⁺ sugere presença de alteração das propriedades immunomodulatórias da MSC em NMP. Contudo, estudos mais aprofundados sobre o secretoma da MSC, e a descrição dos receptores que participam do processo de inibição célula-célula, são necessários para o melhor entendimento e sua possível correlação com a patogênese da NMP.

As células T podem apresentar função antitumoral, sendo capazes de reconhecer células tumorais e promover a sua morte. Assim, a regulação negativa de células T foi associada com o processo de evasão da resposta imunológica que favorece a tumorigênese (BERNARDO; FIBBE, 2013; JELINEK; HAJEK, 2016; ZHANG; GAJEWSKI; KLINE, 2009). Nosso dado indica que as MSC são capazes de inibir as células mononucleares quando em altas proporções, mas em baixas

proporções ativam a proliferação. Podemos entender isto de duas formas, a primeira como uma regulação da célula neoplásica para exercer controle no potencial proliferativo da MSC e garantir que ela não exerça sua função imunossupressora, mas sim pró-tumoral secretando estímulos proliferativos. E a segunda, que ao exibir sua função imunossupressora inibindo as células T, as MSC auxiliariam a célula tumoral favorecendo a sua evasão da resposta imune, permitindo assim a elevação de sua proliferação.

O potencial imunossupressor das MSC também foi explorado em outras doenças hematológicas, como MM e LMA. No mieloma múltiplo, o estudo de Chen e colaboradores (2018) descreveu que as MSC isoladas de camundongos doentes reduziram a proliferação de células T CD4+ de maneira dose-dependente. Este trabalho sugeriu que as MSC exercem esta propriedade por meio de interações célula-célula via receptor PD-1. A ativação do receptor PD-1 nas células T, pelas MSC, ocasiona em um mecanismo regulatório intrínseco que resulta na redução de produção de citocinas e proliferação da célula T. Essa inibição exerce um efeito prótumoral, pois favoreceu crescimento da célula tumoral e aumento o infiltrado inflamatório (CHEN et al., 2018).

As MSC derivadas de pacientes com LMA também apresentam propriedades imunossupressoras mais elevadas do que as exibidas por MSC isoladas de doadores saudáveis. Foi observado um aumento da inibição da proliferação de linfócitos, e diminuição da secreção pela MSC de moléculas pró-inflamatórias, isso foi associado a um efeito quimioprotetor da MSC na célula leucêmica e também a um pior prognóstico desses pacientes (DIAZ DE LA GUARDIA et al., 2017).

Em nosso estudo avaliamos a morte celular das MSC induzida por estaurosporina. Quantificamos também a expressão de genes e microRNAs envolvidos em processos regulatórios da apoptose celular. A resistência à apoptose é umas das características exibidas pelas células neoplásicas nas NMP e está associada à patogênese dessas doenças (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013).

Ao avaliar a sensibilidade das MSC à estaurosporina, a curva-dose resposta gerada nos permitiu a estimativa dos IC50 para as MSC isoladas de pacientes com PV e de doadores saudáveis. Não houve diferença da IC50 de estaurosporina entre os grupos estudados. Porém, ao analisar a viabilidade celular pelo ensaio de MTT, frente a diferentes concentrações de estaurosporina, as MSC do grupo PV exibiram

sensibilidade menor à estauroporina nas concentrações de 1 e 10 µM quando comparado às MSC do grupo CTRL.

O ensaio de sensibilidade das MSC à estaurosporina nos permite avaliar a resposta das MSC frente a um estímulo forte citotóxico, como o os agentes terapêuticos em NMP ou situações de estresse. Nossos resultados demonstraram uma sensibilidade reduzida e isso poderia ser um efeito de uma modulação da célula tumoral visando preservar as MSC alteradas, inclusive esse ganho de função possivelmente favoreça esse tipo celular em detrimento das MSC inalteradas (anteriores ao processo neoplásico).

Ao avaliarmos a expressão de genes reguladores da apoptose (*BAK1, MCL1*, *BIRC2* e *BCL2*) nas MSC isoladas de pacientes com PV, TE, MF, e de doadores saudáveis, o grupo PV exibiu a expressão aumentada do gene antiapoptótico *BIRC2*. O gene pró-apoptótico *BAK1* apresentou tendência de elevação em MF comparado aos demais grupos. Esses resultados também sugerem resistência das MSC de PV à apoptose, provavelmente pelo bloqueio da via intrínseca, corroborando com o dado de menor sensibilidade dessas células à estaurosporina.

Resistência no processo de apoptose foi ainda observada em MSC isoladas de MO de pacientes com NMP. Além disso, quando PV e TE foram agrupadas separadamente, o grupo de PV apresentou menor percentual de apoptose tardia do que o exibido pelo grupo TE, contudo os autores não exploraram as possíveis implicações desse achado com a fisiopatologia das NMP (RAMOS et al., 2017).

Na literatura há diversos relatos de MSC exercendo efeito inibidor de apoptose induzida em células tumorais (KIM et al., 2012b; KONOPLEVA et al., 2002; KURTOVA et al., 2009). Kim e colaboradores (2012) observaram, no mieloma múltiplo, o decaimento da apoptose induzida quando as células tumorais foram cocultivadas com MSC e macrófagos, tal efeito protetor deve estar associado à processos de adesão celular e a secreção de IL-6 e IL-10, pelas MSC e macrófagos (KIM et al., 2012b). Já nas células de LMA, o efeito inibidor da apoptose foi devido ao aumento da regulação dos genes antiapoptóticos *BCL2* e *BCL2L1* que atuam na via intrínseca, promovida pelo estímulo MSC dependente de interações célula-célula (KONOPLEVA et al., 2002). De maneira similar, na leucemia linfocítica crônica, a redução da apoptose induzida requer o contato MSC-célula tumoral, sendo observado a elevação das proteínas pró apoptóticas MCL1 e PARP (KURTOVA et al., 2009).

Por sua vez, o efeito protetor à apoptose foi também demonstrado em células neurais de esclerose amiotrófica lateral cultivadas com 40% de meio condicionado de MSC de MO. Contudo essas interações não foram dependente das interações célulacélula, sendo mediado por mediadores parácrinos secretados pela MSC (SUN et al., 2013).

Para conseguirmos elucidar o possível efeito de uma maior sensibilidade à apoptose nas MSC de PV, e se isso relaciona-se uma modulação via secreção parácrina ou ativação célula-célula, ensaios suplementares, incluindo um cocultivo com células neoplásicas de NMP, são necessários, com também avaliação de qual a possível de apoptose que está sendo bloqueada para o ganho de função.

Os resultados da análise da expressão de microRNAs revelaram a elevação de MIR15A e MIR16-2 no grupo PV comparado ao CTRL e do MIR21 no grupo TE comparado com o grupo PV. As análises de predição de genes alvos mostraram o gene *BCL2* como alvo desses três microRNAs. Todavia, não foi observada associação dos níveis de expressão do gene *BCL2* com estes microRNAs (CIMMINO et al., 2005).

Foi observada apenas associação positiva, entre o MIR16-2 e o gene VEGFA no grupo CTRL. O MIR16-2 é conhecido por suas funções antitumorais, sendo sua regulação associada à ativação da apoptose, inibição da proliferação e da angiogênese (HUANG; LIU; CHU, 2015). Em nossa análise de predição o VEGFA foi um dos genes-alvos associados ao MIR16-2. Contudo, como não foi detectada associação negativa entre os níveis de MIR16-2 e VEGFA, um mecanismo regulatório indireto pode explicar tal efeito de MIR16-2 elevado e também VEGFA. Um dos outros genes preditos para o MIR16-2 é o *IL10RA* (Receptor de interleucina 10 subunidade alpha). Esse receptor é mediador do sinal imunossupressor desempenhado pela IL-10, uma citocina com atividade antiangiogênica conhecida que foi associada a regulação negativa da expressão de VEGF(SHOUVAL et al., 2014). Sugerindo assim, que a correlação positiva observada entre MIR16-2 e *VEGFA* seja devido um mecanismo de regulação indireto, podendo envolver a interação MIR16-2 com *IL10RA*, resultando na elevação de *VEGFA*.

Contudo, outra possível explicação para esta correlação positiva, foi descrito por Chamorro-Horganes e colaboradores (2011), que demonstraram que o aumento de VEGFA e FGF promovem a elevação da expressão das formas precursoras de MIR16, na forma de um mecanismo de autoregulatório (CHAMORRO-JORGANES et al., 2011). Outra questão de nosso trabalho foi avaliar se o nicho hematopoético das NMP possui caráter oncoinflamatório, contribuindo para as propriedades pro-tumorais das MSC.

As análises de citocinas, quimiocinas e fatores pro-angiogênicos revelaram um perfil inflamatório do microambiente medular em pacientes com PV, TE e MF. O grupo CTRL, composto por doadores saudáveis, apresentou microambiente medular com frequência de altos produtores para todos os analitos estudados (citocinas/quimiocinas e fatores pró-angiogênicos) inferior a 50%, indicando ausência de inflamação no nicho hematopoético.

A elevação de VEGFA, IL-8, IFN-γ, IL-17a, IL-18, CCL2 (MCP-1), GM-CSF e TNF-α, foi observada no microambiente medular de pacientes com PV, TE e MF, na comparação com os níveis exibidos pelo grupo CTRL. Continuando a comparação com os resultados observados no grupo CTRL, cada grupo de NMP exibiu um conjunto de analitos que tinham os níveis mais elevados. O grupo de pacientes com PV apresentou níveis aumentados de VEGFA, VEGFR2, IL-6Rα, CXCL10 (IP-10), IL-1β, CCL5 (RANTES), IL-12p70, M-CSF e HGF. O grupo TE, apresentou níveis aumentados de VEGFA, IL-12p70 e M-SCF. E o grupo de pacientes com MF apresentou níveis aumentados de IL-6Rα e CXCL10.

O grupo PV apresentou para todos os analitos estudados elevada frequência de altos produtores, superior à 50%, o que indica marcante desregulação nas citocinas e quimiocinas no nicho hematopoético, o que exerce efeito deletério na hematopoese, uma vez que a célula neoplásica é favorecida por esse microambiente inflamatório, mas não a CTH.

Nos pacientes com TE a frequência superior a 50% de alto produtores foi observada para IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-1β, CCl2, CCl5, VEGFA, VEGFR2 e GM-CSF, o que representa 45% dos analitos avaliados. Os pacientes com MF exibiram percentual de altos produtores maior que 50% apenas para IL6Rα, IL-18, CXCL10 e CCL2, indicando que apesar de apresentar um microambiente medular com alterações marcantes, este não apresenta muita elevação de citocinas e quimiocinas.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa e outros pesquisadores publicaram manuscritos indicando o perfil oncoinflamatório de citocinas e quimiocinas circulantes (sangue periférico) em pacientes com PV, TE e MF (CACEMIRO et al., 2018; HOERMANN; GREINER; VALENT, 2015; POURCELOT et al., 2014; TEFFERI et al., 2011; VAIDYA et al., 2012). No SP, os pacientes com MF foram os que exibiram o

perfil mais inflamatório, com frequência superior à 50% de alto produtores para GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-10, IFN- α , IL-12p70, TNF- α e CXCL10. Os pacientes com PV foram aqueles que exibiram a menor frequência de altos produtores para citocinas e quimiocinas inflamatórias entre os grupos de NMP (CACEMIRO et al., 2018).

Tefferi e colaboradores (2011) avaliaram 127 pacientes com MF e reportaram elevação das citocinas pró-inflamatórias circulantes IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- α , G-CSF, IFN- α , CCL2, CXCL10, HGF, VEGFA e receptores IL1RA, IL2R. Além disso, IL-8, IL-2R, IL-12 E IL-15 foram apontados como fatores de prognóstico para sobrevida de pacientes com MF, onde a elevação dessas citocinas foi associada a menor sobrevida (TEFFERI et al., 2011).

Níveis diminuídos de IL-12p70 e GM-CSF foram associados aos pacientes com PV que não exibiram eventos vasculares, sendo sugerido pelos autores desse estudo o uso de IL-12p70 e GM-CSF como uma ferramenta de predição de riscos de complicações vasculares(POURCELOT et al., 2014).

Pelo exposto, nossos dados em conjunto com os publicados na literatura indicam a existência de um perfil diferencial de citocinas/quimiocinas entre as categorias nosológicas e entre os sítios hematopoéticos (medula óssea e sangue periférico).

Os relatos a respeito do *milieu* de citocinas e quimiocinas presentes na MO das NMP são raros, sendo a maioria estudos utilizando biópsias de MO e análises imunohistoquímicas (CHOU; LI; TEFFERI, 2003; LUNDBERG et al., 2000).

Lundberg e colaboradores (2000) observaram que as amostras, de biópsias de MO, de pacientes com MF e LMC exibem aumento da densidade vascular e de células positivas para a marcação com VEGFA, revelando potencial processo neoangiogênese associada à patogênese dessas doenças (LUNDBERG et al., 2000). Resultados similares foram relatados por Chou e colaboradores (2003) que analisaram MO de pacientes com MF relatando níveis elevados de VEGF e TGF-β, que resultam na elevação da angiogênese (CHOU; LI; TEFFERI, 2003).

Na comparação do perfil de citocinas, quimiocinas e substâncias proangiogênicas entre os grupos de NMP, os pacientes com PV apresentaram níveis aumentados de VEGFA, IL-10, IFN-γ, M-CSF, TNF-α e HGF em relação aos pacientes com MF, e níveis aumentados de CXCL10 e HGF em comparação com os pacientes com TE. O grupo de pacientes com TE apresentou níveis aumentados de VEGFA e CCL5 comparado ao grupo MF. A concentração de CCL5 foi maior no grupo de PV em relação ao grupo de MF, mas a análise estatística indicou apenas uma tendência a significância (p=0,0503). Os níveis medulares de IL-6, CXCL12 (SDF-1α) e G-CSF foram similares entres os grupos controle e de pacientes com NMP.

Estes resultados sugerem que o HGF, o CCL2 e o VEGFA poderiam ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico diferencial entre pacientes com PV, TE e MF.

O microambiente medular proporciona para as MSC o condicionamento capaz de alterar seu fenótipo. O perfil pró-inflamatório da MSC, ou MSC1, apresenta características antitumorais, pode ser ativado principalmente por interações com o receptor TLR4, e induz a secreção de IL-6 e IL-8 pela MSC, que promoverá por sua vez, na ativação e proliferação de células T. O perfil imunomodulatórios, ou MSC2, apresenta características pró-tumorais, pode ser ativado principalmente por interações com o receptor TLR3, e induz a secreção de CCL5, CXCL10 e TGF-β, que atuam inibindo a ativação e proliferação de células T (RIVERA-CRUZ et al., 2017). A polarização para o perfil MSC2 pode ser induzida por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no microambiente em que a MSC reside (ROMIEU-MOUREZ et al., 2009). Assim, as MSC isoladas de pacientes PV estavam em um microambiente que favorecia a polarização para o seu perfil imunossupressor.

Para compreender o envolvimento desse nicho hematopoético inflamatório e as MSC isoladas deles e sua possível polarização, uma análise de expressão dos genes envolvidos na inflamação e angiogênese foi realizada em MSC de PV e CTRL. Esta análise revelou a alta expressão de *IL6* e tendência de elevação dos níveis de expressão de VEGFA nas mesenquimais do grupo PV em relação ao grupo controle.

De maneira contrastante, as MSC apresentaram a expressão elevada de *IL6,* associada ao perfil pró-inflamatório e antitumoral. Contudo, não pesquisamos a presença de *CXCL10, CCL5* e *TGF,* o que poderia nos ajudar a elucidar o perfil exibido pela MSC isolada de pacientes com PV. Não podemos deixar de discutir também que as condições de expansão *in vitro* não fornecem os mesmos estímulos do que os presentes na MO. E nesse caso, pode ser crucial para a polarização da MSC. Assim, ao retirarmos essa MSC do microambiente inflamatório e da presença da célula tumoral, podemos não observar seu real perfil/polarização.

Ainda assim, a elevação de VEGFA e sua associação aos processos neoplásicos foi amplamente explorada pela literatura (MEDINGER et al., 2009;

PODAR, 2005). A IL-6 atua como fator indutor para a expressão de *VEGFA* por meio da ativação da via de sinalização JAK/STAT3 (VAINCHENKER; CONSTANTINESCU, 2013). Níveis elevados de IL-6 foram encontrados em células senescentes, e esse processo pode ocorrer em resposta à estímulos oncogênicos (KUILMAN et al., 2008).

A secreção de IL-6 e VEGFA por MSC exerce efeito pró-tumoral em células do câncer de mama e aumento a migração celular das células neoplásicas (DE LUCA et al., 2012). No mieloma múltiplo, a secreção elevada de IL-6, VEGF, TGF- β e TNF- α foram observadas em MSC associadas ao aumento da sobrevivência, proliferação e migração da célula tumoral (XU et al., 2018). A elevação dos níveis circulantes de VEGFA, IL-6, IL-8 e TNF- α foi encontrado em pacientes com NMP (TEFFERI et al., 2011; VAIDYA et al., 2012).

Assim, os resultados elevados de VEGFA e IL6 verificados nas MSC de pacientes com PV sugerem contribuição da MSC para promoção da neoangiogênese no nicho hematopoético de pacientes com NMP.

Com o intuito de avaliar a interação da MSC com as outras células do nicho hematopoético, foram analisados os conteúdos das vesículas derivadas de MSC de pacientes com PV e doadores saudáveis.

A análise do conteúdo das vesículas derivadas de MSC de pacientes com PV revelou a presença de mRNA de *VEGFA, IL6* e *CXCL8.* Contudo, não conseguimos quantificar e assim comparar com os valores encontrados em vesículas derivadas de MSC de doadores saudáveis. Na literatura, a presença de mRNA para o *VEGF* foi demonstrada em vesículas extracelulares derivadas de MSC isoladas do cordão umbilical, que desempenham funções regenerativas em modelo de lesão pulmonar neonatal (AHN et al., 2018). No mieloma múltiplo, as vesículas derivadas de células MSC desempenham importante sinalização já correlacionada a fisiopatologia dessa doença, na qual se observa a presença de IL-6, CCL2, e a diminuição de MIR15a, MIR340 (ROCCARO et al., 2013; UMEZU et al., 2017). Na LMA, as vesículas de MSC são enriquecidas com TGF- β e marcadores de prognóstico da doença, MIR155 e MIR375 (VIOLA et al., 2016).

Análises proteômicas do conteúdo de vesículas derivadas de MSC revelaram a presença de CXCL8, VEGF e TGF-β, que desempenham funções pró-angiogênicas (COULTAS; CHAWENGSAKSOPHAK; ROSSANT, 2005). De maneira similar, a transferência de MIR126, VEGF, foi associada à promoção da angiogênese (TODOROVA et al., 2017).

Nakamura e colaboradores demonstraram a presença de VEGF e IL-6 em vesículas extracelulares derivadas de MSC de MO. Estes autores discutiram que a sinalização celular pode ocorrer por estas vesículas extracelulares (NAKAMURA et al., 2015).

Em suma, em conjunto os dados aqui mostrados e discutidos apontam para alterações do microambiente medular em pacientes com NMP. Tal conhecimento do microambiente medular de pacientes com NMP permite a melhor compreensão da fisiopatologia das NMP em nível medular. Os dados, portanto, indicam a potencial participação das MSC e dos mediadores solúveis do microambiente medular na patogênese das NMP.



п

Considerando a literatura estudada e nossas análises comparativas entre as amostras dos pacientes e voluntários sadios, os dados apresentados e discutidos, conclui-se que:

 As MSC isoladas da MO de pacientes com PV, TE e MF possuem perfil imunofenotípico e multipotencialidade similares às das MSC isoladas da MO de indivíduos normais;

 As MSC da MO de pacientes com PV, TE e MF são mais difíceis de serem estabelecidas *in vitro* e se expandem mais lentamente do que as MSC de indivíduos saudáveis;

 As MSC isoladas de pacientes com PV apresentam resistência ao processo de morte celular, alterações moleculares e em suas propriedades imunomodulatórias;

 O microambiente medular de pacientes PV, TE e MF apresentam perfil oncoinflamatório e pró-angiogênico, contrastando com o perfil apresentado pelo grupo CTRL.

8. Referências Bibliográficas

AHN, S. Y. et al. Vascular endothelial growth factor mediates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles against neonatal hyperoxic lung injury. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 4, p. 26, 13 2018.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 2016.

AVANZINI, M. A. et al. Functional and genetic aberrations of in vitro-cultured marrowderived mesenchymal stromal cells of patients with classical Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 28, n. 8, p. 1742–1745, ago. 2014.

BALLEN, K. K. et al. Outcome of transplantation for myelofibrosis. **Biology of Blood** and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, v. 16, n. 3, p. 358–367, mar. 2010.

BANFI, A. et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 6, p. 707–715, jun. 2000.

BARBUI, T. et al. Elevated C-reactive protein is associated with shortened leukemiafree survival in patients with myelofibrosis. **Leukemia**, v. 27, n. 10, p. 2084–2086, out. 2013.

BERNARDO, M. E.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 392–402, 3 out. 2013.

BOCK, O. et al. Bone morphogenetic proteins are overexpressed in the bone marrow of primary myelofibrosis and are apparently induced by fibrogenic cytokines. **The American Journal of Pathology**, v. 172, n. 4, p. 951–960, abr. 2008.

BOIRET, N. et al. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 2, p. 219–225, fev. 2005.

BRUNO, S. et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 20, n. 5, p. 1053–1067, maio 2009.

BRUNO, S. et al. Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 5, p. 758–771, 1 mar. 2013.

CACEMIRO, M. DA C. et al. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms as disorders marked by cytokine modulation. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 2, p. 120–131, jun. 2018.

CAIVANO, A. et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancyrelated markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9739–9752, dez. 2015. CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1445–1451, jun. 2017.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 932–936, 15 dez. 2005.

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

CHAMORRO-JORGANES, A. et al. MicroRNA-16 and MicroRNA-424 Regulate Cell-Autonomous Angiogenic Functions in Endothelial Cells via Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 and Fibroblast Growth Factor Receptor-1. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 11, p. 2595–2606, nov. 2011.

CHEN, D. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote cell proliferation of multiple myeloma through inhibiting T cell immune responses via PD-1/PD-L1 pathway. **Cell Cycle**, v. 17, n. 7, p. 858–867, 3 abr. 2018.

CHEN, J.; LI, C.; CHEN, L. The Role of Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells in Lung Diseases. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 985814, 2015.

CHEN, Y. et al. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 5, p. 815–820, jan. 2008.

CHOU, J. M.; LI, C.-Y.; TEFFERI, A. Bone marrow immunohistochemical studies of angiogenic cytokines and their receptors in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Leukemia Research**, v. 27, n. 6, p. 499–504, jun. 2003.

CIMMINO, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 13944–13949, 27 set. 2005.

COCCO, C. et al. Cytokines as anti-angiogenic agents in haematological malignancies. **Current Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 9, p. 997–1004, nov. 2011.

COLTER, D. C.; SEKIYA, I.; PROCKOP, D. J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 14, p. 7841–7845, 3 jul. 2001.

COULTAS, L.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; ROSSANT, J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 937–945, 15 dez. 2005.

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

DAZZI, F. et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. **Blood Reviews**, v. 20, n. 3, p. 161–171, maio 2006.

DE LUCA, A. et al. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 11, p. 3363–3370, nov. 2012.

DEISSEROTH, A. et al. U.S. Food and Drug Administration approval: ruxolitinib for the treatment of patients with intermediate and high-risk myelofibrosis. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 12, p. 3212–3217, 15 jun. 2012.

DEJEAN, L. M. et al. MAC and Bcl-2 family proteins conspire in a deadly plot. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1797, n. 6–7, p. 1231–1238, jul. 2010.

DIAS, S. et al. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. **Blood**, v. 99, n. 7, p. 2532–2540, 1 abr. 2002.

DIAZ DE LA GUARDIA, R. et al. Detailed Characterization of Mesenchymal Stem/Stromal Cells from a Large Cohort of AML Patients Demonstrates a Definitive Link to Treatment Outcomes. **Stem Cell Reports**, v. 8, n. 6, p. 1573–1586, 06 2017.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DWEEP, H.; GRETZ, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nature Methods**, v. 12, n. 8, p. 697, ago. 2015.

ENGLISH, K. et al. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 1, p. 149–160, abr. 2009.

FAVALORO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, n. 5, p. 330–349, maio 2012.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230–247, mar. 1968.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, jan. 2012.

GAO, X. et al. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. **Development** (Cambridge, England), v. 145, n. 2, 22 2018.

GATTI, S. et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. **Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 26, n. 5, p. 1474–1483, maio 2011.

GNECCHI, M. et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, v. 103, n. 11, p. 1204–1219, 21 nov. 2008.

GREEN, D. R.; FITZGERALD, P. Just So Stories about the Evolution of Apoptosis. **Current biology: CB**, v. 26, n. 13, p. R620–R627, 11 2016.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 19 mar. 2010.

GRONTHOS, S. et al. Surface protein characterization of human adipose tissuederived stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 189, n. 1, p. 54–63, out. 2001.

GUGLIELMELLI, P. et al. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: hidden behind the reticulum. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 5, p. 453–456, maio 2014.

HARRISON, C. N. et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. **Leukemia**, v. 31, n. 3, p. 775, 2017.

HASSELBALCH, H. C. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? **Leukemia Research**, v. 37, n. 2, p. 214–220, fev. 2013.

HOERMANN, G.; GREINER, G.; VALENT, P. Cytokine Regulation of Microenvironmental Cells in Myeloproliferative Neoplasms. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 869242, 2015.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393–395, 2005.

HOUEN, G. COMMENTARY: Calreticulin - Oncogene, Anti-oncogene, or Both? **Current Protein & Peptide Science**, v. 20, n. 1, p. 111–112, 2019.

HUANG, E.; LIU, R.; CHU, Y. miRNA-15a/16: as tumor suppressors and more. **Future Oncology (London, England)**, v. 11, n. 16, p. 2351–2363, 2015.

HUANG, J. C. et al. Mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia bone marrow exhibit aberrant cytogenetics and cytokine elaboration. **Blood Cancer Journal**, v. 5, n. 4, p. e302, 10 abr. 2015.

JAMES, C. et al. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. **Leukemia**, v. 20, n. 2, p. 350–353, fev. 2006.

JELINEK, T.; HAJEK, R. PD-1/PD-L1 inhibitors in multiple myeloma: The present and the future. **Oncolmmunology**, v. 5, n. 12, p. e1254856, dez. 2016.

JONES, S. et al. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 179, n. 5, p. 2824–2831, 1 set. 2007.

KACZANOWSKI, S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. **Physical Biology**, v. 13, n. 3, p. 031001, 11 2016.

KALE, J.; OSTERLUND, E. J.; ANDREWS, D. W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 65–80, 2018.

KATO, T. Searching for the molecular basis of bipolar disorder. **The American Journal** of **Psychiatry**, v. 172, n. 11, p. 1057–1058, 1 nov. 2015.

KAUSHANSKY, K.; ZHAN, H. The marrow stem cell niche in normal and malignant hematopoiesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 14 fev. 2019.

KHWAJA, A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. **British Journal of Haematology**, v. 134, n. 4, p. 366–384, ago. 2006.

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

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

KIM, E.-J.; KIM, N.; CHO, S.-G. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, p. e2, 10 jan. 2013.

KIM, H.-S. et al. Proteomic Analysis of Microvesicles Derived from Human Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 2, p. 839–849, 3 fev. 2012a.

KIM, J. et al. Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. **British Journal of Haematology**, v. 158, n. 3, p. 336–346, ago. 2012b.

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

KONOPLEVA, M. et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. **Leukemia**, v. 16, n. 9, p. 1713–1724, set. 2002.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 99–163, jan. 2007.

KUILMAN, T. et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukindependent inflammatory network. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1019–1031, 13 jun. 2008. KURTOVA, A. V. et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. **Blood**, v. 114, n. 20, p. 4441–4450, 12 nov. 2009.

KUSUMA, G. D. et al. Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. **Stem Cells and Development**, v. 26, n. 9, p. 617–631, 01 2017.

KVASNICKA, H. M. et al. Long-term effects of ruxolitinib versus best available therapy on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 42, 15 mar. 2018.

LATAILLADE, J.-J. et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. **Blood**, v. 112, n. 8, p. 3026–3035, 15 out. 2008.

LEVI, B. et al. CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 45, p. 39497–39509, 11 nov. 2011.

LI, M. et al. Mesenchymal stem cells suppress CD8+ T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- β . **Clinical and Experimental Immunology**, v. 178, n. 3, p. 516–524, dez. 2014.

LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 253–270, 1 fev. 2001.

LUNDBERG, L. G. et al. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 1, p. 15–19, jul. 2000.

LUSSANA, F.; RAMBALDI, A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. **Journal of Autoimmunity**, v. 85, p. 58–63, dez. 2017.

MALEKI, M. et al. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells. International Journal of Stem Cells, v. 7, n. 2, p. 118–126, 30 nov. 2014.

MARTINAUD, C. et al. Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Cells Contributes to Primary Myelofibrosis. **Cancer Research**, v. 75, n. 22, p. 4753–4765, 15 nov. 2015.

MASCARENHAS, J.; MUGHAL, T. I.; VERSTOVSEK, S. Biology and clinical management of myeloproliferative neoplasms and development of the JAK inhibitor ruxolitinib. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 26, p. 4399–4413, 2012.

MEDINGER, M. et al. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor-/receptor expression in myeloproliferative neoplasms: correlation with clinical parameters and JAK2-V617F mutational status. **British Journal of Haematology**, v. 146, n. 2, p. 150–157, jul. 2009.

MEDYOUF, H. The microenvironment in human myeloid malignancies: emerging concepts and therapeutic implications. **Blood**, v. 129, n. 12, p. 1617–1626, 23 2017.

MEIRELLES, L. DA S. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 5–6, p. 419–427, dez. 2009.

MORAES, D. A. et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 97, dez. 2016.

MUKAIDA, N.; TANABE, Y.; BABA, T. Chemokines as a Conductor of Bone Marrow Microenvironment in Chronic Myeloid Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, 22 ago. 2017.

NAKAMURA, Y. et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. **FEBS Letters**, v. 589, n. 11, p. 1257–1265, 8 maio 2015.

NALDINI, A.; CARRARO, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. **Current Drug Targets. Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 1, p. 3–8, fev. 2005.

NANGALIA, J.; GREEN, A. R. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. **Blood**, v. 130, n. 23, p. 2475–2483, 07 2017.

NAUTA, A. J. et al. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 177, n. 4, p. 2080–2087, 15 ago. 2006.

NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in cancer. Vascular Health and Risk Management, v. 2, n. 3, p. 213–219, 2006.

NUNES, N. S. et al. Differential expression of apoptomiRs in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia & Lymphoma**, v. 54, n. 9, p. 2047–2051, set. 2013.

NWABO KAMDJE, A. H. et al. Mesenchymal stromal cells' role in tumor microenvironment: involvement of signaling pathways. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 2, p. 129–141, maio 2017.

ORLIC, D. et al. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. **Pediatric Transplantation**, v. 7 Suppl 3, p. 86–88, 2003.

O'SHEA, J. J.; GADINA, M.; SCHREIBER, R. D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. **Cell**, v. 109 Suppl, p. S121-131, abr. 2002.

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

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

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 2 abr. 1999.

PODAR, K. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1383–1395, 15 fev. 2005.

POURCELOT, E. et al. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: Clinical implications. **Experimental Hematology**, v. 42, n. 5, p. 360–368, maio 2014.

QUESENBERRY, P. J. et al. Cellular phenotype and extracellular vesicles: basic and clinical considerations. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 13, p. 1429–1436, 1 jul. 2014.

RACHIDI, S. M. et al. Molecular profiling of multiple human cancers defines an inflammatory cancer-associated molecular pattern and uncovers KPNA2 as a uniform poor prognostic cancer marker. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e57911, 2013.

RAHMAN, M. M. et al. CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2014.

RAMAKRISHNAN, A.; JOACHIM DEEG, H. A novel role for the marrow microenvironment in initiating and sustaining hematopoietic disease. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 9, n. 1, p. 21–28, jan. 2009.

RAMOS, T. L. et al. Mesenchymal stromal cells (MSC) from JAK2+ myeloproliferative neoplasms differ from normal MSC and contribute to the maintenance of neoplastic hematopoiesis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182470, 10 ago. 2017.

REVENFELD, A. L. S. et al. Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 830–846, 1 jun. 2014.

RIVERA-CRUZ, C. M. et al. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell Polarization within the Tumor Microenvironment Niche. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 4015039, 2017.

ROCCARO, A. M. et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 4, p. 1542–1555, 1 abr. 2013.

ROMIEU-MOUREZ, R. et al. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 7963–7973, 15 jun. 2009.

RUMI, E.; CAZZOLA, M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 680–692, 9 fev. 2017.

SACCHETTI, B. et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 324–336, out. 2007.

SAMSONRAJ, R. M. et al. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 12, p. 2173–2185, dez. 2017.
SCOTT, L. M. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 5, p. 459–468, 1 fev. 2007.

SH SWERDLOW; CAMPO, E.; HARRIS, N. **WHO Classification of Tumours of Haematopietic and Lymphoid Tissues.** Lyon, France: [s.n.].

SHOUVAL, D. S. et al. Interleukin 10 Receptor Signaling. In: Advances in Immunology. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 122p. 177–210.

SILVENNOINEN, O.; HUBBARD, S. R. Molecular insights into regulation of JAK2 in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 125, n. 22, p. 3388–3392, 28 maio 2015.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 457–478, 2011.

STENVANG, J. et al. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. **Silence**, v. 3, n. 1, p. 1, 9 jan. 2012.

SUN, H. et al. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells and MSC Conditioned Medium in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) - In Vitro Evidence from Primary Motor Neuron Cultures, NSC-34 Cells, Astrocytes and Microglia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72926, 12 set. 2013.

TAKAM KAMGA, P. et al. Notch signalling drives bone marrow stromal cell-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, p. 21713–21727, 19 abr. 2016.

TEFFERI, A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 33, p. 8520–8530, 20 nov. 2005.

TEFFERI, A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. **Leukemia**, v. 24, n. 6, p. 1128–1138, jun. 2010.

TEFFERI, A. et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 29, n. 10, p. 1356–1363, 1 abr. 2011.

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

TEFFERI, A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 1, p. 50–58, jan. 2016.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 12, p. 1551–1560, dez. 2018.

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

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Mutations and prognosis in myeloproliferative neoplasms. Leukemia & Lymphoma, p. 1–2, 14 nov. 2018.

TEFFERI, A.; VANNUCCHI, A. M. Genetic Risk Assessment in Myeloproliferative Neoplasms. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 92, n. 8, p. 1283–1290, 2017.

THÉRY, C. et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, v. Chapter 3, p. Unit 3.22, abr. 2006.

TODOROVA, D. et al. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. **Circulation Research**, v. 120, n. 10, p. 1658–1673, 12 maio 2017.

TOGNON, R. et al. Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in chronic myeloproliferative diseases. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 1, p. 75–82, jan. 2011.

TOGNON, R. et al. Deregulation of apoptosis-related genes is associated with PRV1 overexpression and JAK2 V617F allele burden in Essential Thrombocythemia and Myelofibrosis. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 5, p. 2, 2 fev. 2012.

TOGNON, R.; NUNES, N. DE S.; CASTRO, F. A. DE. Apoptosis deregulation in myeloproliferative neoplasms. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 11, n. 4, p. 540–544, dez. 2013.

TRIPODO, C. et al. Persistent Immune Stimulation Exacerbates Genetically Driven Myeloproliferative Disorders via Stromal Remodeling. **Cancer Research**, v. 77, n. 13, p. 3685–3699, 01 2017.

TYNDALL, A.; GRATWOHL, A. Adult stem cell transplantation in autoimmune disease: **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 4, p. 285–291, jul. 2009.

TZANKOV, A. et al. Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 5, p. 476–482, maio 2007.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–736, set. 2008.

UMEZU, T. et al. Replenishing exosomes from older bone marrow stromal cells with miR-340 inhibits myeloma-related angiogenesis. **Blood Advances**, v. 1, n. 13, p. 812–823, 23 maio 2017.

VAIDYA, R. et al. Plasma cytokines in polycythemia vera: Phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 11, p. 1003–1005, nov. 2012.

VAINCHENKER, W. et al. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1723–1735, 18 ago. 2011.

VAINCHENKER, W.; CONSTANTINESCU, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. **Oncogene**, v. 32, n. 21, p. 2601–2613, 23 maio 2013.

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

VANNUCCHI, A. M. et al. Ruxolitinib reduces JAK2 p.V617F allele burden in patients with polycythemia vera enrolled in the RESPONSE study. **Annals of Hematology**, v. 96, n. 7, p. 1113–1120, jul. 2017.

VECCHIONE, A.; CROCE, C. M. Apoptomirs: small molecules have gained the license to kill. **Endocrine-Related Cancer**, v. 17, n. 1, p. F37-50, mar. 2010.

VERSTOVSEK, S. et al. Ruxolitinib versus best available therapy in patients with polycythemia vera: 80-week follow-up from the RESPONSE trial. **Haematologica**, v. 101, n. 7, p. 821–829, 2016.

VIOLA, S. et al. Alterations in acute myeloid leukaemia bone marrow stromal cell exosome content coincide with gains in tyrosine kinase inhibitor resistance. **British Journal of Haematology**, v. 172, n. 6, p. 983–986, mar. 2016.

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

WAN, C.-D. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT**, v. 7, n. 1, p. 29–33, fev. 2008.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 2, p. 93–106, fev. 2006.

XU, S. et al. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: a therapeutical tool or target? **Leukemia**, 22 fev. 2018.

YU, G. et al. Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes. **Cytotherapy**, v. 12, n. 4, p. 538–546, jul. 2010.

ZAMAN, S.; WANG, R.; GANDHI, V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. **Leukemia & Lymphoma**, v. 55, n. 9, p. 1980–1992, set. 2014.

ZEUNER, A. et al. Increased death receptor resistance and FLIPshort expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3495–3502, 1 maio 2006.

ZHANG, L. 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, n. 10, p. 1199–1206, out. 2004.

ZHANG, L.; GAJEWSKI, T. F.; KLINE, J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. **Blood**, v. 114, n. 8, p. 1545–1552, 20 ago. 2009.

ZHAO, Z.-G. et al. Phenotypic and Functional Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Bone Marrow of Normal Adults and Patients with Hematologic Malignant Diseases. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 4, p. 637–648, ago. 2007.

9. Apêndices ł

Policitemia vera	Idade	Gênero	Cor de pele	Mutação	Medicamento	Risco	ETP	Grau fibrose medular (0- 4)
MOP59	66	Masculino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	não	1
MOP1	56	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	sim	1
MOP7	57	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	sim	1
MOP11	68	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	sim	0
MOP25	62	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	não	1
MOP30	51	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Baixo	não	1
MOP31	72	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	não	2
MOP34	63	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	não	0
MOP43	71	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	não	0
MOP45	61	Masculino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	não	0
MOP47	31	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Baixo	não	0
MOP51	62	Masculino	Negro	JAK2V617F	não	Alto	sim	0

APÊNDICE 1. Dados demográficos, diagnóstico, *status* mutacional e informações clínicas de pacientes com NMP. Amostras em negrito foram as que fizeram parte do grupo de estudo deste trabalho.

Trombocitemia essencial	ldade	Gênero	Cor de pele	Mutação	Medicamento	Risco	ETP	Grau Fibrose medular (1- 4)
MOP3	76	Feminino	Branco	Negativo JAK2	não	Alto	sim	2
MOP16	29	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Baixo	não	0
MOP23	74	Feminino	Branco	CALR	sim - Hidroxiuréia	Alto	não	2
MOP28	57	Masculino	Branco	CALR	não	Baixo	não	0
MOP35	72	Masculino	Negro	JAK2V617F	sim - Hidroxiuréia	Alto	não	2
MOP38	46	Feminino	Branco	JAK2V617F	sim - Hidroxiuréia	Baixo	não	0
MOP39	82	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	não	0
MOP46	77	Masculino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	sim	0
MOP48	61	Masculino	Branco	Negativo JAK2	não	Intermediário	não	0
MOP53	51	Feminino	Parda	Negativo JAK2	não	Baixo	não	0
MOP58	69	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	sim	0

Mielofibrose primária	Idade	Gênero	Cor de pele	Mutação	Medicamento	Risco	ETP	Grau Fibrose medular (0- 4)	Fase
MOP4	63	Masculino	Branco	CALR	não	Baixo	não	1	Celular
MOP5	76	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto - DIPSS 2	não	2	Pré-fibrótica
MOP8	42	Masculino	Branco	JAK2V617F	sim - Hidroxiuréia	Baixo	não	3	Celular
MOP15	63	Masculino	Branco	JAK2V617F	não	Baixo	não	0	Celular
MOP20	44	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto - DIPSS Plus Intermediário 1	não	-	Celular
MOP21	74	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto - DIPSS Plus Intermediário 1	não	3	Pré-fibrótica
MOP22	66	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	sim	3	Pré-fibrótica
MOP26	51	Masculino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	não	3	Celular
MOP49	68	Masculino	Branco	Negativo JAK2	não	Intermediário - DIPSS Plus Intermediário 2	não	-	Pré-fibrótica
MOP52	71	Feminino	Negro	CALR	não	Alto	não	3	Pré-fibrótica
MOP54	68	Masculino	Branco	JAK2V617F	sim - Hidroxiuréia	Intermediário	não	2	Pré-fibrótica
MOP55	69	Feminino	Branco	Negativo JAK2	não	Alto - DIPSS Plus intermediário 2	Sim	2	Pré-fibrótica
MOP56	71	Masculino	Branco	JAK2V617F	não	Alto	sim	-	Pré-fibrótica
MOP57	75	Feminino	Branco	JAK2V617F	não	DIPSS Alto - DIPSS Plus intermediário 2	não	2	Pré-fibrótica

Controles	Idade	Gênero	Cor de pele
CTRL1	36	Masculino	Branco
CTRL2	24	Feminino	Branco
CTRL3	37	Masculino	Branco
CTRL4	34	Feminino	Branco
CTRL5	19	Masculino	Branco

APÊNDICE 2. Dados demográficos de doadores saudáveis – Controles.

APÊNDICE 3. Dados demográficos, diagnóstico, status mutacional e informações clínicas de pacientes com	NMP
--	-----

Policitemia secundária	Idade	Gênero		Cor de pele
MOP6	45	Masculino		Branco
MOP9	41	Masculino		Branco
MOP17	56	Masculino		Branco
MOP24	75	Masculino		Branco
MOP36	71	Masculino		Branco
MOP44	80	Feminino		Branco
MOP50	38	Masculino		Branco
Outros	Idade	Gênero	Cor de pele	Diagnóstico
MOP2		Masculino		SMD/NMP
MOP12	75	Feminino	Branco	Hemoglobinopatia de Coimbra
MOP13	30	Feminino	Branco	Eosinofilia a esclarecer
MOP27	68	Feminino	Branco	Câncer gastro e doença de Chagas

MOP37	70	Feminino	Mulato	Câncer de mama
				Transtorno funcional de neutrófilos,
MOP59	44	Feminino	Branco	leucocitose constitucional
Sem diagnóstico	Idade	Gênero	Cor de pele	Suspeita
MOP10	64	Masculino	Branco	Mielofibrose primária - fase celular
				Trombocitemia essencial ou Mielofibrose
MOP19	75	Masculino	Branco	primária
MOP40	32	Feminino	Branco	Trombocitemia essencial
MOP60	65	Masculino	Branco	Policitemia vera
MOP61	61	Masculino	Mulato	Trombocitemia essencial
				Leucemia mielóide crônica ou policitemia
MOP62	48	Feminino	Mulato	vera
MOP63	63	Masculino	Branco	Policitemia vera

APÊNDICE 4. Dados demográficos, diagnóstico, *status* mutacional de pacientes com NMP pertencentes ao biorrepositório da Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro.

CTRL	Mutação	Idade	Gênero	Cor de pele
MOC11		68	Feminino	branco
MOC13		49	Feminino	branco
MOC15		50	Masculino	branco
MOC16		46	Feminino	branco
MOC17		83	Feminino	branco
MOC18		31	Feminino	branco
MOC19		66	Feminino	negro
MOC20		58	Masculino	branco
MOC22		54	Feminino	negro
MOC23		72	Masculino	branco

MOC24		38	Feminino	branco
MOC25		60	Feminino	branco
PV	Mutação	Idade	Gênero	Cor de pele
MOP59	JAK2V617F	65	Masculino	branco
MOP77	JAK2V617F	76	Masculino	pardo
MOP80	JAK2V617F	46	Masculino	branco
MOP83	JAK2V617F	75	Masculino	branco
MOP86	JAK2V617F	57	Masculino	branco
MOP90	JAK2V617F	61	Masculino	pardo
MOP96	JAK2V617F	78	Masculino	branco
MOP101	JAK2V617F	69	Feminino	pardo
MOP102	JAK2V617F	61	Feminino	branco
MOP105	JAK2V617F	78	Feminino	branco
MOP106	JAK2V617F	67	Masculino	branco
MOP108	JAK2V617F	65	Masculino	branco
MOP87	JAK2V617F	51	Feminino	branco
MOP71	JAK2V617F	63	Masculino	branco
MOP85	JAK2V617F	60	Masculino	branco
TE	Mutação	Idade	Gênero	Cor de pele
MOP12	Negativo JAK2	66	Feminino	branco
MOP28	JAK2V617F	74	Feminino	branco
MOP53	Negativo JAK2	62	Masculino	branco
MOP54	Negativo JAK2	59	Feminino	branco
MOP55	JAK2V617F	35	Feminino	branco
MOP56	Negativo JAK2	85	Feminino	branco
MOP66	Negativo JAK2	77	Feminino	branco
MOP76	Negativo JAK2	76	Feminino	
MOP78	Negativo JAK2	20	Feminino	branco
MOP79	Negativo JAK2	54	Masculino	branco

MOP75	Negativo JAK2	61	Feminino	
MOP88	Negativo JAK2	44	Masculino	branco
MOP91	JAK2V617F	36	Feminino	branco
MF	Mutação	Idade	Gênero	Cor de pele
MOP91	JAK2V617F	36	Feminino	branco
MOP50	JAK2V617F	59	Feminino	branco
MOP51	JAK2V617F	58	Masculino	branco
MOP122	JAK2V617F	67	Masculino	branco
MOP113	Negativo JAK2	65	Feminino	branco
MOP52	JAK2V617F	62	Masculino	branco
MOP58	Negativo JAK2	69	Masculino	branco
MOP69	Negativo JAK2	73	Masculino	negro
MOP72	JAK2V617F	80	Masculino	branco
MOP97	JAK2V617F	73	Masculino	branco
MOP103	JAK2V617F	79	Masculino	branco



П

Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Comitê de Ética em Pesquisa Of. CEP/FCFRP nº. 030/2016 kms Ribeirão Preto, 03 de outubro de 2016. À Pós-graduanda Juçara Gastaldi Gominal Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Attié de Castro FCFRP/USP Prezada Pesquisadora, Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "EXPRESSÃO DE APOPTOMIRS EM MICROVESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 408 -CAAE nº 55545716.6.0000.5403, foi aprovado pelo do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 155ª reunião ordinária realizada em 12 de agosto de 2016. Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local". Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil. Atenciosamente, momachad PROF^a. DR^a. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO Coordenadora do CEP/FCFRP

> Comitê de Ética em Pesquisa FCFRP/USP Avenida do Café s/nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP Fone: (16) 3315-4213 – Fax: (16) 3315-4892 - cep@fcfrp.usp.br

Anexo B. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FMRP-USP RIBEIRÃO PRETO Ribeirão Preto, 26 de agosto de 2016 Projeto de pesquisa: "Expressão de ApoptomiRs em microvesículas extracelulares de células estromais mesenquimais multipotentes de neoplasias Mieloproliferativas" Pesquisador responsável: JUÇARA GASTALDI COMINAL e PROF^a DR^a FABÍOLA ATTIÉ DE CASTRO Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP "O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bemestar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar". Ciente e de acordo: Marco Dr^a Marcia Guimarães Villanova Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho Coordenadora do Comitê de Coordenador Técnico Científico da Ética em Pesquisa - HCFMRP-Unidade de Pesquisa Clínica -USP HCFMRP-USP Campus Universitário – Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro Plataforma Brasil/CONEP nº 5440 (016) 3602-2228 cep@hcrp.usp.br www.hcrp.usp.br

Anexo C. Aprovação do Biorrepositório do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, sob responsabilidade da Profa. Fabíola Attié de Castro.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 033/2013 dfav

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2013.

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

Prezado Pesquisador,

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

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

Atenciosamente,

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

Avenida do Café S/N^L - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP Comité de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br Fone: (16) 3602-4213 ou 3602-4216 – Fax: (16) 3602-4892 **Anexo D.** Termo de consentimento livre e esclarecido para a colheita de amostras de medula óssea, para voluntários saudáveis.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Doador de Medula Óssea (Controle)

Nome do Paciente:	Idade:
Responsável (se necessário):	

Título do Projeto de pesquisa: "Expressão de ApoptomiRs em microvesículas extracelulares de Células Estromais Mesenquimais Multipotentes".

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

Pesquisadoras responsáveis:

Doutoranda: Juçara Gastaldi Cominal (telefone: 016-98104-6401)

Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro - Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP (telefones: 016-3315-4163 e 016-98177-9222)

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a ceder o uso de uma amostra de medula óssea para essa pesquisa. As doenças estudadas em nossa pesquisa são a Policitemia vera, a Trombocitemia essencial e a Mielofibrose primária. Essas doenças levam a um aumento do número de células no sangue, esse excesso faz com que o sangue fique mais grosso, e isso faz com que ele circule nas veias do nosso corpo com maior dificuldade. As causas do aparecimento dessas doenças são desconhecidas, por isso, queremos estudar as possíveis alterações que levam ao aumento do número de células e que fazem com que algumas pessoas desenvolvam essas doenças.

Prezado doador voluntário, por ser sadio, o convidamos para participar de nossa pesquisa, para que seja integrante de nosso grupo controle (grupo de pessoas que não apresentam as doenças a serem estudada, que terão as características de suas células comparadas das células de pacientes com Policitemia vera, Trombocitemia essencial e Mielofibrose primária), pois o maior conhecimento sobre essas doenças poderá ajudar os pesquisadores a desenvolverem melhores formas de tratamento, beneficiando, no futuro, pessoas que possam estar doentes.

Caso concorde, o(a) Senhor(a) doará uma amostra de 15 mL de medula óssea (o correspondente a 1 colher de sopa). O volume que será utilizado para esse estudo não trará prejuízo para a sua saúde e também não irá prejudicar o objetivo inicial da sua doação, que é o transplante. A coleta deste material será realizada pelo médico no momento da coleta de medula óssea para o transplante, desta forma não haverá necessidade de uma nova coleta. As células da medula óssea serão usadas para estudar alguns de seus componentes chamados de proteínas, genes e microRNAs, que controlam a vida e o aumento dessas células.

Se aceitar participar desse estudo, sua amostra de medula óssea e seus componentes serão guardados sob a responsabilidade da Professora Fabíola Attié de Castro, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Sua amostra e os seus dados coletados serão identificados por números sequenciais (ex: SPP113), de modo que garanta seu sigilo. Somente os resultados da pesquisa serão divulgados. Se você quiser, podemos lhe informar sobre os resultados da pequisas sempre que desejar, tendo a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa.

Você tem a liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja empregada nesse estudo, sem que lhe cause qualquer prejuízo ou punição do atendimento que lhe for prestado. Você não terá nenhum custo ou gasto para participar dessa pesquisa e você não será pago por doar o sangue para a pesquisa. Sua doação será voluntária. No momento essa pesquisa não lhe trará nenhum benefício, mas poderá trazer benefícios no futuro para outras pessoas que tenham as doenças estudas por este estudo.

O(a) Senhor(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato com a pesquisadora responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones que aparecem no final deste documento. Você poderá recorrer às leis vigentes no Brasil para indenização de qualquer dano que lhe seja causado pelo estudo.

Eu, Juçara Gastaldi Cominal, RG:43.197.565-6, declaro que tudo o que foi exposto anteriormente é verdade e será devidamente cumprido.

Nome do pesquisador responsável pelo estudo: Juçara Gastaldi Cominal

Assinatura do pesquisador:_____

Ribeirão Preto,_____de _____de _____.

Eu, _____, RG: _____, residente na Rua _____

_____(número, bairro, cidade, telefone/celular), declaro que aceito ser voluntário e que minha amostra biológica de medula óssea seja utilizada para realização da pesquisa científica. Fui devidamente informado em detalhes pelos responsáveis do projeto sobre meus direitos, que o volume de medula óssea retirado não causará danos, que esta pesquisa ajudará a entender o que causa ou aumento do número de células do sangue nos pacientes com neoplasias mieloprolifertaivas crônicas e que terei minha identididade mantida em sigilo.

Assinatura do Doador: _____

Ribeirão Preto, ____ de_____ de _____.

Se o doador não puder assinar:

Nome do representante:_____

Assinatura:_________de _______de ________de _______.

Informações importantes:

Telefone do Comitê de ética da FCFRP-USP: Fone: (16) 3315-4213. Fax: (16) 3315-4892 Endereço: FCFRP-USP, Av. do Café, s/n – Campus Universitário – Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14049-903 Telefone do Comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Fone: (16) 3602-2228. Fax: (16) 3633-1144 Endereço: HCFMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3.900 - Campus Universitário - Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14.048-900 **Anexo E.** Termo de consentimento livre e esclarecido para a colheita de amostras de medula óssea, para pacientes com NMP.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Doador de Medula Óssea (Paciente)

Nome do Paciente:	Idade:
Responsável (se necessário):	

Título do Projeto de pesquisa: "Expressão de ApoptomiRs em microvesículas extracelulares de Células Estromais Mesenquimais Multipotentes".

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

Pesquisadoras responsáveis:

Doutoranda: Juçara Gastaldi Cominal (telefone: 016-98104-6401)

Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro - Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP (telefones: 016-3315-4163 e 016-98177-9222)

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a ceder o uso de uma amostra de medula óssea para essa pesquisa. As doenças estudadas em nossa pesquisa são a Policitemia vera, a Trombocitemia essencial e a Mielofibrose primária. Essas doenças levam a um aumento do número de células no sangue, esse excesso faz com que o sangue fique mais grosso, e isso faz com que ele circule nas veias do nosso corpo com maior dificuldade. As causas do aparecimento dessas doenças são desconhecidas, por isso, queremos estudar as possíveis alterações que levam ao aumento do número de células e que fazem com que algumas pessoas desenvolvam essas doenças.

Caso concorde, o(a) Senhor(a) doará uma amostra de 15 mL de medula óssea (o que corresponde a 1 colher de sopa). O volume que será utilizado para esse estudo não trará prejuízo para a sua saúde e também não irá prejudicar o objetivo inicial que é a realização dos exames requisitados pelo seu médico. A coleta deste material será realizada pelo médico no momento da coleta para os exames de punção e biópsia da medula óssea, desta forma não haverá necessidade de uma nova coleta. As células da medula óssea serão usadas para estudar alguns de seus componentes chamados de proteínas, genes e microRNAs, que controlam a vida e o aumento dessas células.

Se aceitar participar desse estudo, sua amostra de medula óssea e seus componentes serão guardados sob a responsabilidade da Professora Fabíola Attié de Castro, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Sua amostra e os seus dados coletados serão identificados por números sequenciais (ex: MOP113), de modo que garanta seu sigilo. Somente os resultados da pesquisa serão divulgados. Se você quiser, podemos lhe informar sobre os resultados da pequisas sempre que desejar, tendo a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa.

Você tem a liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja empregada nesse estudo, sem que lhe cause qualquer prejuízo ou punição do atendimento que lhe for prestado. Você não terá nenhum custo ou gasto para participar dessa pesquisa e você não será pago por doar o sangue para a pesquisa. Sua doação será voluntária. No momento essa pesquisa não lhe trará nenhum benefício, mas poderá trazer benefícios no futuro para outras pessoas que tenham as doenças estudas por este estudo.

O(a) Senhor(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato com a pesquisadora responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones que aparecem no final deste documento. Você poderá recorrer às leis vigentes no Brasil para indenização de qualquer dano que lhe seja causado pelo estudo.

Eu, Juçara Gastaldi Cominal, RG:43.197.565-6, declaro que tudo o que foi exposto anteriormente é verdade e será devidamente cumprido.

Nome do pesquisa	dor responsá	ivel pelo	estudo : Ju	çara Ga	staldi Co	ominal			
Assinatura do peso	quisador:								
Ribeirão Preto,	de		de						
Eu,								,	RG:
	, resi	idente	na	Rua_					
pesquisa científica. I direitos, que o volu entender o que cau mieloprolifertaivas c	Fui devidamer me de medula sa ou aument rônicas e que	anostra c nte informa a óssea r to do nún terei minh	ado em det etirado não nero de cé na identidid	alhes pe o causa lulas do ade mai	rá danos sangue ntida em	onsávei s, que e nos pa sigilo.	s do projet esta pesqu cientes co	to sobre r lisa ajuda im neopla	neus ará a asias
Assintura do Pacie	ente:						_		
Ribeirão Preto,	de		de		_·				
Se o doador não pu	der assinar:								
Nome do representa	ante:								
Assinatura:									
Ribeirão Preto,	de		de		·				

Informações importantes:

Telefone do Comitê de ética da FCFRP-USP: Fone: (16) 3315-4213. Fax: (16) 3315-4892 Endereço: FCFRP-USP, Av. do Café, s/n – Campus Universitário – Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14049-903 Telefone do Comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Fone: (16) 3602-2228. Fax: (16) 3633-1144 Endereço: HCFMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3.900 - Campus Universitário - Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14.048-900 **Anexo F.** Termo de consentimento livre e esclarecido para o armazenamento de amostras biológicas no Biorrepositório do Laboratório de Hematologia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Armazenamento de Amostras Biológicas

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

Caso concorde, o(a) Senhor(a) doará uma amostra de sangue periférico e/ou medula óssea. A coleta do sangue poderá causar dor, inchaço ou rouxidão no local da coleta e as vezes tontura leve. Esta sua amostra e os seus dados coletados serão identificados por números, de modo que seu nome não apareça. Após coletada, a amostra será guardada por 10 anos em um BIORREPOSITÓRIO (banco de amostras biológicas), intitulado Biorrepositório do Laboratório de Hematologia da FCFRP, localizado no laboratório de hematologia, sala multiusuários 46A-M, segundo andar do bloco M da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-RP em condições adequeadas de armazenamento, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a Fabíola Attié de Castro. Ao final deste tempo de armazenamento, a amostra será jogada fora.

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

Caso não concorde em doar sangue periférico e/ou medula óssea ou desista de permitir que se guarde esta amostra, essa decisão não lhe trará qualquer penalização ou prejuízo do atendimento que lhe for prestado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (HCFMRP-USP).

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

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

Esta pesquisa não lhe trará nenhum custo ou gasto, entretanto, caso seja necessário, os gastos decorrentes da pesquisa serão ressarcidos e em caso de dano também decorrente da pesquisa o(a) senhor(a) será indenizado.

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

Prof.^a Dr^a. Fabiola Attié de Castro (16)3315-4163/ (16)98177-9222 castrofabiola@hotmail.com

Consentimento do Sujeito de Pesquisa

Eu,				, RG:,					
residente	na	Rua							
		(númer	o, bairro,	cidade, telel	fone / c	elular), a	ceito qu	ue minha am	nostra
biológica	de san	gue (células,	plasma,	proteínas,	DNA,	cDNA,	RNA,	microRNA)	seja
armazena	da pela	Prof. ^a Dr ^a . Fab	iola Attié	de Castro n	a Facul	dade de	Ciência	as Farmacê	uticas
de Ribeirã	io Preto	da USP para	fins de	pesquisa ci	entífica	. Declar	o estar	ciente de o	que a
previsão d	e guard	a do material é	de no m	áximo 10 ai	nos.				

Ribeirão Preto,	de	de		
Assinatura	do	Doador	ou	responsável
legal:				

Anexo G. Termo de consentimento livre e esclarecido para a colheita de amostras de sangue periférico de doadores saudáveis.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Participante de Pesquisa: Grupo Controle)

Nome do Participante:	Idade:	
RG:		

Título do Projeto de pesquisa: "Expressão de ApoptomiRs em microvesículas extracelulares de Células Estromais Mesenquimais Multipotentes de Neoplasias Mieloproliferativas"

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

Pesquisadoras responsáveis:

Doutoranda: Juçara Gastaldi Cominal (telefone: 016-981046401)

Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro - Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP (telefones: 016-3315-4163 e 016-98177-9222)

Prezado (a),

Convidamos você a participar de nossa pesquisa.

As doenças estudadas em nossa pesquisa são a Policitemia vera, a Trombocitemia essencial e a Mielofibrose primária. Essas doenças levam a um aumento do número de células no sangue, esse excesso faz com que o sangue fique mais grosso, e isso faz com que ele circule nas veias do nosso corpo com maior dificuldade. As causas do aparecimento dessas doenças são desconhecidas, por isso, queremos estudar as possíveis alterações que levam ao aumento do número de células e que fazem com que algumas pessoas desenvolvam essas doenças.

Prezado doador voluntário, por ser sadio, o convidamos para participar de nossa pesquisa, para que seja integrante de nosso grupo controle (grupo de pessoas que não apresentam as doenças a serem estudada, que terão as características de suas células comparadas das células de pacientes com Policitemia vera, Trombocitemia essencial e Mielofibrose primária), pois o maior conhecimento sobre essas doenças poderá ajudar os pesquisadores a desenvolverem melhores formas de tratamento, beneficiando, no futuro, pessoas que possam estar doentes.

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

Se aceitar participar desse estudo, as células de seu sangue e seus componentes serão guardados sob a responsabilidade da Professora Fabíola Attié de Castro, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Somente os resultados da pesquisa serão divulgados, sem que

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

Você tem a liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja empregada nesse estudo, sem que lhe cause qualquer prejuízo ou punição do atendimento que lhe for prestado. Você não terá nenhum custo ou gasto para participar dessa pesquisa e você não será pago por doar o sangue para a pesquisa. Sua doação será voluntária. No momento esta pesquisa não lhe trará nenhum benefício, mas poderá trazer benefícios no futuro para outras pessoas que tenham as doenças estudas por este estudo.

O(a) Senhor(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Para desistir, basta entrar em contato com a pesquisadora responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones que aparecem no final deste documento.

Você receberá uma via desse termo, assinada pela pesquisadora responsável.

Eu, Juçara Gastaldi Cominal, RG:43.197.565-6, declaro que tudo o que foi exposto anteriormente é verdade e será devidamente cumprido.

Nome do pesquisador responsável pelo estudo: Juçara Gastaldi Cominal

Assinatura do pesquisador:		
•••		

Ribeirão Preto,_____de _____de _____.

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

Endereço:______ Telefone:______

Assinatura do participante:_____

Ribeirão Preto, _____de _____de _____.

Informações importantes:

Telefone do Comitê de ética da FCFRP-USP: Fone: (16) 3315-4213. Fax: (16) 3315-4892 Endereço: FCFRP-USP, Av. do Café, s/n – Campus Universitário – Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14049-903 Telefone do Comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Fone: (16) 3602-2228. Fax: (16) 3633-1144

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