UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeito de *SMADs* e de microRNAs na expressão gênica de *TGF-β1* e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose e trombocitemia essencial

Daniela Prudente Teixeira Nunes

Tese para a obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeito de *SMADs* e de microRNAs na expressão gênica de *TGF-β1* e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose e trombocitemia essencial

Daniela Prudente Teixeira Nunes

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para a obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo
2015

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

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Nunes, Daniela Prudente Teixeira
N972e Efeito de *SMADs* e de microRNAs na expressão gênica de *TGF-β1* e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose e trombocitemia essencial / Daniela Prudente Teixeira Nunes. -- São Paulo, 2015.
183p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Guerra Shinohara, Elvira Maria

1. Hematologia 2. Expressão gênica 3. Citocinas I. T. II. Guerra Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.15 CDD

Daniela Prudente Teixeira Nunes

Efeito de *SMADs* e de microRNAs na expressão gênica de *TGF-β1* e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose e trombocitemia essencial

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Orientadora/ presidente

Profa. Dra. Kátia Borgia Barbosa Pagnano
1º examinador

Ricardo José Giorrdano
2º examinador

Alice Cristina Rodrigues
3º examinador

Helder Takashi Imoto Nakaya
4º examinador

São Paulo, 07 de agosto de 2015.

DEDICATÓRIA

Àqueles que sempre me incentivaram e apoiaram nas jornadas do conhecimento científico e da vida: meus pais, Ramon Lombardi Teixeira Nunes e Myriam Daniele Prudente Teixeira Nunes. Obrigada por toda a estrutura de amor e carinho, por estarem sempre presentes, por serem meu maior exemplo. Eu os amo incondicionalmente.

À minha querida irmã, Débora Prudente Teixeira Nunes, minha amiga que eu tanto amo e admiro, por toda a força, carinho e apoio que sempre me proporcionou.

Ao meu companheiro, André Batistuzzo, que esteve comigo do começo ao fim dessa jornada, obrigada pelo apoio, amor e incentivo dedicados, fundamentais para a concretização desse trabalho. Obrigada pelo carinho e pelas maiores demonstrações de amor e paciência que poderiam existir.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo (FCF/ USP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela minha bolsa de doutorado (Processo 141564/2012-1).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão do apoio financeiro para a realização dessa pesquisa (Processo 2012/12957-5).

À minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Elvira Maria Guerra Shinohara, pela oportunidade de realização dessa tese e por toda a sua contribuição para a minha formação científica.

À minha amiga e companheira de equipe, Luciene Terezina de Lima, não tenho nem palavras para agradecer tudo que você ela pelo nosso projeto e o quanto a estimo.

Ao Guilherme Wataru Gomes, que esteve sempre ao nosso lado e contribuiu muito em diversas etapas do projeto.

Aos colaboradores desse projeto, Dra. Maria de Lourdes Chauffaille, Dra. Regina Régis Silva, Dr. César Cilento Ponce, Dr. Marcelo Gil Cliquet, Dr. Marcos Tadeu dos Santos, Dr. Miguel Mitne Neto, por toda a disposição e conhecimento oferecidos, sem vocês esse projeto não teria se realizado.

À Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues, pelo auxílio com as análises de expressões de microRNAs, sempre muito prestativa, cujos conhecimentos foram fundamentais para a concretização dessas análises.

À Celina Garcia Yassui, pela participação e apoio no início do projeto. Apesar de ser a aluna de iniciação científica, aprendi muito com ela.

À Profa. Dra. Rosário Crespo Hirata e Prof. Dr. Mario Hirata, pela cessão do uso de equipamentos e disponibilidade para discussões.

À Profa. Ana Campa, pela disponibilização de equipamentos que possibilitaram a realização de diversas etapas desse projeto.

À *American Society of Hematology*, pelo auxílio financeiro para a concretização do meu estágio no *MD Anderson Cancer Center* (Houston, EUA).

Ao Dr. George Adrian Calin, que me proporcionou a oportunidade de estagiar no *MD Anderson Cancer Center*, por ter me recebido em seu laboratório, contribuindo para o meu crescimento científico e pessoal. Aos colegas do laboratório, em especial à Katrien Van Roosbroeck e Lucilla D'Abundo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, à Dra. Vania Hungria e à Dra. Maria Aparecida Zanichelli pelas sugestões e direcionamentos que fizeram na qualificação.

Aos médicos e funcionários do Hemocentro e do Ambulatório de Hematologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), especialmente à Dra. Carolina Malafaia, Dra. Aline Santos Borgo e Dra. Sandra Rohr, pelo espaço e liberdade que nos deram na seleção e acompanhamento dos pacientes, e à Dores, que nos auxiliou em diversos momentos, principalmente nas coletas mais difíceis.

Aos médicos e funcionários do Ambulatório de Hematologia do Departamento de Medicina da FCMS-PUC/SP, pela seleção dos pacientes e coletas de medula óssea.

Ao Antônio Carlos de Sousa, pela assistência técnica com o preparo e coloração das lâminas de imunoistoquímica, e ao Edson, do laboratório de Hematologia Experimental da FCF/ USP, pelo auxílio com as colorações das lâminas de medula óssea.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao diagnóstico, principalmente: Cristina Moreno Fajardo, Juliana Germano, Vivian Bonezi e Gabriela Guimarães Sousa Leite. Todas de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos pacientes que contribuíram anonimamente para esse estudo.

Aos meus amigos do Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/ USP. Obrigada por tudo, não tenho nem palavras para agradecer e demonstrar o quanto vocês são especiais pra mim: Luciene Terezina de Lima, Guilherme Wataru Gomes, Patrícia Mendonça da Silva Amorim, Clóvis Paniz, Juliano Bertinato, Maylla Rodrigues Lucena. E aos que já não estão mais no laboratório, mas também fizeram a diferença, meu muito obrigada!

Enfim, a todos aqueles de direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desse trabalho.

'Cause love's such an old fashioned word
And love dares you to care for
The people on the edge of the night
And loves dares you to change our way of
Caring about ourselves
Queen (Under Pressure)

RESUMO

NUNES, D. P. T. **Efeito de *SMADs* e de microRNAs na expressão gênica de *TGF-β1* e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose e trombocitemia essencial.** 2015. 177f. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

OBJETIVO: Investigar o efeito da expressão de RNAm dos *SMADs* e de microRNAs (miRNAs) que possuem o *TGFB1* como alvo na expressão gênica (RNAm e proteína) de TGF-β1 e seu papel na fisiopatologia da angiogênese em pacientes com mielofibrose (MF) e trombocitemia essencial (TE). **MÉTODOS:** Foram incluídos 21 pacientes com MF primária (MFP), 21 com MF pós-TE (MFPTE) e 24 com TE, além de 98 indivíduos controles pareados de acordo com gênero e idade com os pacientes. As análises realizadas no sangue periférico foram: quantificação das concentrações plasmáticas e de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2*; quantificação de RNAm de *SMADs 1* a *7* e de miRNAs 193a-5p, 369-5p, 542-5p, 590-3p, e 590-5p; e detecção das mutações *JAK2V617F* (com quantificação alélica), *MPLW515K/L* e *CALR*. Em 26 biópsias de medula óssea dos pacientes, foram determinados o grau de microvasculatura (angiogênese estimada – CD34), a imunoexpressão de TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL. **RESULTADOS:** As concentrações de TGF-β1 plasmático foram semelhantes entre os pacientes e controles, enquanto o VEGFA plasmático foi maior em todos os grupos de pacientes comparados aos seus controles. O FGF2 plasmático também foi maior em todos os grupos de pacientes, e a expressão de seu RNAm foi maior nos pacientes com TE do que em seus controles. As expressões de *SMADs* e de miRNAs foram semelhantes entre pacientes e controles. TGF-β1 e FGF2 plasmáticos apresentaram correlações positivas nos pacientes com MFP, e correlações negativas nos seus controles, assim como nos controles de MFPTE. Em todos os grupos estudados foi observada correlação positiva entre TGF-β1 e VEGFA plasmáticos. Além disso, foram demonstrados diferentes perfis de correlações entre a expressão gênica de TGF-β1 e os diversos SMADs e miRNAs em cada grupo de pacientes e controles. Os pacientes com MFP com maior angiogênese (de acordo com a mediana da concentração plasmática de VEGFA e FGF2) apresentaram maiores concentrações plasmáticas de TGF-β1 do que aqueles com menor angiogênese. A angiogênese medular estimada (CD34) não foi diferente entre os três grupos de pacientes estudados. Além disso, não foram encontradas correlações entre a imunoexpressão de CD34 e as expressões de RNAm de *TGFB1, VEGFA* e *FGF2* medulares nem em leucócitos de sangue periférico, ou a concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2. As imunoexpressões de TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL foram semelhantes entre os três grupos de pacientes. As frequências das mutações avaliadas foram similares às descritas na literatura. Os pacientes com MFPTE portadores de mutação *CALR* apresentaram menores concentrações plasmáticas de VEGFA e FGF2 do que os *JAK2V617F* positivos, enquanto os pacientes com TE portadores de mutação *CALR* exibiram menores concentrações plasmáticas de TGF-β1 do que os portadores de *JAK2V617F*. **CONCLUSÕES:** O presente trabalho permitiu confirmar a correlação positiva entre o TGF-β1 com outros dois marcadores de angiogênese (VEGFA e FGF2). As expressões de *SMADs* e de miRNAs estudados foram semelhantes entre pacientes e controles, visto não haver diferenças na expressão gênica de *TGF-β1*. Entretanto,

disparidades encontradas nas correlações entre a expressão gênica de *TGF-β1* e diferentes *SMADs* e miRNAs nos pacientes e controles poderiam indicar que a regulação da expressão gênica de *TGF-β1* nas doenças estudadas seja distinta da apresentada nos indivíduos sem essas doenças.

Palavras-chave: mielofibrose, trombocitemia essencial, angiogênese, SMAD, microRNA

ABSTRACT

NUNES, D. P. T. Effects of *SMADs* and microRNAs in *TGF-β1* gene expression and its role in the angiogenesis pathophysiology in myelofibrosis and essential thrombocythemia patients. 2015. 177f. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

AIM: To investigate the effects of the expression of *SMADs* mRNA and microRNAs (miRNAs) that target *TGFB1* in TGF-β1 gene expression (mRNA and protein) and its role in the angiogenesis pathophysiology in myelofibrosis (MF) and essential thrombocythemia (ET) patients. **METHODS:** Twenty-one primary MF (PMF), twenty-one MF post-ET (MPET) and twenty-four ET patients were included, besides 98 controls matched for gender and age with patients. In peripheral blood were assessed: TGF-β1, VEGFA and FGF2 plasmatic levels and mRNA quantification; *SMADs 1* to *7* mRNA quantification and miRNAs 193a-5p, 369-5p, 542-5p, 590-3p, and 590-5p quantification; and detection of *JAK2V617F* (and allele burden), *MPLW515K/L* and *CALR* mutations. Estimated angiogenesis (microvessel grade - CD34), active TGF-b1, latent TGF-β and c-MPL immunoexpression were determined in 26 bone marrow biopsies. **RESULTS:** Plasmatic TGF-β1 levels were similar in patients and controls, while all the patients groups had higher plasmatic VEGFA than controls. Plasmatic FGF2 was higher in all the patients groups, and its mRNA expression was higher in ET patients than in controls. No differences in *SMADs* and miRNAs expression were found between patients and controls. There was a positive correlation between plasmatic TGF-β1 and FGF2 in PMF, and a negative correlation between these variables in their controls, as well as in MPET controls. In all studied groups, there was a positive correlation between plasmatic TGF-β1 and VEGF. In addition, different profiles of correlations were demonstrated between TGF-β1 gene expression and the several SMADs and miRNAs studied in each group of patients and controls. PMF patients with higher angiogenesis (according to the median of VEGFA and FGF2 plasma levels) had higher plasmatic TGF-β1 levels than those with lower angiogenesis. Estimated angiogenesis (CD34) in bone marrow biopsies were not different among PMF, MPET and ET patients. Moreover, there were no correlation between CD34 immunoexpression and *TGFB1*, *VEGFA* and *FGF2* mRNA bone marrow or peripheral blood expression or plasmatic levels, as well as latent TGF-β1, active TGF-b1, and c-MPL immunoexpression were similar in patients studied groups. The frequencies of evaluated mutations were similar to previously reported. MPET patients harboring *CALR* mutations had lower plasmatic VEGFA and FGF2 than *JAK2V617F* mutated, while ET patients carrying *CALR* mutations had lower plasmatic TGF-β1 than *JAK2V617F* mutated. **CONCLUSIONS:** This study confirmed the positive correlation among TGF-β1 and two other markers of angiogenesis (VEGFA and FGF2). *SMADs* and miRNAs expressions were similar between patients and controls, since there were no differences in TGF-β1 gene expression between patients and controls. However, disparities found in the correlations between TGF-β1 gene expression and different *SMADs* and miRNAs in patients and controls may indicate that TGF-β1 gene expression regulation in studied diseases is distinct from those presented by individuals without these diseases.

Keywords: myelofibrosis, essential thrombocythemia, angiogenesis, SMAD, microRNA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação das neoplasias mieloproliferativas crônicas. 30

Figura 2 - Via de sinalização JAK-STAT. 32

Figura 3 - Estrutura da proteína Janus Quinase 2 (JAK2) - Domínios de Homologia. 33

Figura 4 - Alguns dos componentes angiogênicos do tumor/ microambiente microvascular. 50

Figura 5 - Transdução de sinal da superfamília do TGF-β. 52

Figura 6 - Biogênese e regulação dos microRNAs.....57

Figura 7 - Posição dos genes de referência candidatos, como determinado pelo software GeNorm. 66

Figura 8 - Esquema representativo das classificações de pacientes e controles incluídos no estudo. 80

Figura 9 - Concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2 nos pacientes com mielofibrose primária (A, C e E) e mielofibrose pós-trombocitemia essencial (B, D e F) e nos seus respectivos controles.....86

Figura 10 - Concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2 nos pacientes com trombocitemia essencial e nos seus controles. 88

Figura 12 - Expressões de RNAm dos genes *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* nos pacientes com trombocitemia essencial e no grupo controle. 89

Figura 13 - Fotomicrografias da densidade microvascular para a imunoexpressão de CD34 (400x). 102

Figura 14 - Fotomicrografia da imunoexpressão de TGF-b1 ativo (400x). 103

Figura 15 - Fotomicrografia da imunoexpressão de TGF-β1 latente (400x).....103

Figura 16 - Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Mpl (400x). 103

Figura 17 - Curvas da análise da amostra positiva para a mutação *W515L* no gene *MPL*. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de risco para mielofibrose primária segundo a classificação DIPPS-Plus 38

Tabela 2 - Categorias de risco segundo a DIPSS-plus para o prognóstico da mielofibrose primária, média de sobrevida e conduta empregada em cada caso.....38

Tabela 3 - Critérios diagnósticos para mielofibrose primária e mielofibrose pós-trombocitemia essencial.....41

Tabela 4 - Critérios diagnósticos para trombocitemia essencial de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008).....46

Tabela 5 - Características dos ensaios *Taqman*® empregados para avaliação da expressão dos genes de referência candidatos pela técnica de PCR em tempo real 655

Tabela 6 - Características dos ensaios *Taqman*® empregados para avaliação da expressão dos genes *TGFB1*, *VEGFA*, *FGF2* e *SMAD1* a *SMAD8/9* 67

Tabela 7 - Características dos ensaios *Taqman*® empregados para avaliação da expressão dos SnoRNAs de referência candidatos pela técnica de PCR em tempo real 69

Tabela 8 - Características dos ensaios Taqman® empregados para avaliação das expressões de miR-193a-5p, miR-369-5p, miR-542-5p, miR-590-5p e miR-590-3p pela técnica de PCR em tempo real.....70

Tabela 9 - Avaliação da imunoexpressão em medula óssea de TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-Mpl.....73

Tabela 10 - Características dos prímers e sondas Taqman® empregados para quantificação dos alelos *JAK2V617F* 75

Tabela 11 - Características dos primers e sondas Taqman® empregados para detecção das mutações *MPLW515K/L*.....75
Tabela 12 - Características dos primers empregados para a amplificação da região alvo no gene *CALR* 76
Tabela 13 - Características gerais e clínicas dos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e dos seus respectivos controles 81
Tabela 14 - Dados hematológicos e de proteína C reativa ultrassensível dos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e dos seus respectivos controles 82
Tabela 15 - Classificação de risco DIPSS-Plus dos pacientes com mielofibrose primária 83
Tabela 16 - Modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e de VEGFA e FGF2 nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles.....91
Tabela 17 - Modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e RNAm de *VEGFA*, *FGF2*, e *SMADs 1* a *7* nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles.....92
Tabela 18 - Modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e expressões de miRNAs nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles.....93

Tabela 19 - Modelos de correlações de Spearman entre expressões de RNAm de *TGFB1* e concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2 nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles.....94
Tabela 20 - Modelos de correlações de Spearman entre expressões de RNAm de *TGFB1* e de *VEGFA*, *FGF2* e *SMADs 1* a *7* nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles.....95
Tabela 21 - Modelos de correlações de Spearman entre expressões de RNAm de *TGFB1* e expressões de miRNAs nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles.....96
Tabela 22 - Modelos de regressões lineares simples e multivariadas para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1 nos pacientes com MIELOFIBROSE PRIMÁRIA 97
Tabela 23 - Modelos de regressões lineares simples e multivariadas para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1 nos pacientes com MIELOFIBROSE PÓS-TROMBOCITEMIA ESSENCIAL.....98
Tabela 24 - Modelos de regressões lineares simples e multivariadas para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1 nos pacientes com TROMBOCITEMIA ESSENCIAL 99
Tabela 25 - Concentrações plasmáticas e expressões de RNAm de *TGFB1* em pacientes com valores de FGF2 e VEGFA plasmáticos concomitantemente menores ou maiores que a mediana 101

Tabela 26 - Frequências de imunoexpressões de CD34, TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente, c-MPL e em pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial.....104
Tabela 27 - Concentrações plasmáticas e expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* e dados hematológicos dos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial positivos para a mutação *JAK2V617F* segundo a mediana da carga alélica.....106
Tabela 28 - Distribuições das frequências das mutações no gene CALR nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial.....108
Tabela 29 - Características clínicas e hematológicas dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de mutações nos genes *CALR* e *JAK2* 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ACTB	Beta-actina
ActR	Receptor de ativina
Ago	Argonaute
AKT	Proteína quinase B
ALK	Quinases similares a receptores de ativina
B2M	Beta-2-microglobulina
Bcl-x	Linfoma de grandes células B
BMC	Células da médua óssea
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMPR	Receptor de proteína morfogenética óssea
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
cMPL	Receptor de MPL
Co-Act	Co-ativador
Co-Smad	Smad mediador comum
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIPSS	Sistema de Escore Prognóstico Internacional Dinâmico
EGFR	Receptor de fator de crescimento endotelial
EPO	Eritropoietina
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular
Exp-5	Exportina-5
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos

FGF2/ bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GM-CSF	Fator estimulante de colônias granulocítico-macrofágicas
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HIF	Fator induzido por hipóxia
HMBS	Hidroximetil butirato sintase
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
IFN	Interferon
IGF	Fator de crescimento similar à insulina
IgG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IPSS	Sistema de Escore Prognóstico Internacional
I-Smad	Smad Inibidor
JAK	Janus quinase
JH	Domínios de homologia JAK
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LAP	Peptídeo associado à latência
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LNK	Homologia 2-B3 de Scr
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MF	Mielofibrose
MFP	Mielofibrose primária

MFPPV	Mielofibrose pós-policitemia vera
MFPTE	Mielofibrose pós-trombocitemia essencial
miRNA	MicroRNA
MKK3	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno 3
MPL	Leucemia mieloproliferativa
NMP	Neoplasia mieloproliferativa
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fosforilação
PAI-1	Inibidor tecidual do plasminogênio
PCRus	Proteína C reativa ultrassensível
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas
Ph	Philadelphia (cromossomo)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIGF	Fator de crescimento placentário
Pré-miRNA	miRNA precursor
Pri-miRNA	miRNA transcrito primário
PV	Policitemia Vera
RDW	Variação de tamanho
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RPM	Rotações por minuto
R-Smad	Smad receptor-regulador
SCF	Fator de célula tronco
SDF	Fator derivado de células estromais
Ser/Thr	Serina/ Treonina

SH2	Domínio de homologia Scr
SMD	Síndrome mielodisplásica
SnoRNA	Pequeno RNA nucleolar
SOCs	Supressores da sinalização de citocinas
STAT	Transdutores de sinais e ativadores da transcrição
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	Trombocitemia essencial
TF	Fator de transcrição
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
TPO	Trombopoetina
TYK2	Não-receptor de proteína tirosinoquinase
TβR	Receptor de fator de transformação do crescimento
UBC	Ubiquitina
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 27

2 REVISÃO DA LITERATURA 29

2.1 Neoplasias mieloproliferativas 29

2.1.1 Mutação JAK2V617F 30

2.1.2 Mutações W515K/L no gene MPL e outras mutações 34

2.1.3 Mutações no gene CALR 35

2.2 Mielofibrose primária 36

2.2.1 Epidemiologia 37

2.2.2 Aspectos clínicos e laboratoriais 39

2.2.3 Critérios diagnósticos 40

2.2.4 Fisiopatologia 41

2.2.5 Tratamento 43

2.3 Trombocitemia essencial 44

2.3.1 Epidemiologia 44

2.3.2 Aspectos clínicos 44

2.3.3 Critérios diagnósticos 45

2.3.4 Fisiopatologia 47

2.3.5 Tratamento 48

2.4 Angiogênese 48

2.4.1 TGFB1 50

2.4.2 VEGFA 53

2.4.3 FGF2 55

2.4.4 MiRNAs 55

3 OBJETIVOS 58

3.2 Objetivos Específicos 58

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS 58

4.1 Aspectos Éticos 60

4.2 Casuística 60

4.2.1 Pacientes 60

4.2.2 Controles 61

4.3 Amostras biológicas 62

4.4 Métodos 62

4.4.1 Determinação do hemograma e de PCRus 62

4.4.2 Dosagem das concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2 ... 63

4.4.3 Extração e avaliação da qualidade de RNA de sangue periférico e de medula óssea 63

4.4.4 Síntese de DNA complementar (cDNA) para as análises de RNAm 64

4.4.5 Escolha do gene de referência para as análises de RNAm 64

4.4.7 Síntese de cDNA para as análises de miRNAs 67

4.4.8 Seleção de pequenos RNAs nucleolares (SnoRNAs) de referência para análise dos miRNAs 68

4.4.9 Quantificação das expressões de miRNAs (miR-193a-5p, miR-369-5p, miR-542-5p, miR-590-5p e miR-590-3p) por PCR em tempo real 70

4.4.10 Determinações do mielograma e/ou da biópsia da medula óssea 70

4.4.11 Análise citogenética para pesquisa de alterações cromossomais 71

4.4.12 Análises imunoistoquímicas 71

4.4.12.1 Preparo das amostras 71

4.4.12.2 Angiogênese estimada – grau de microvasculatura 72

4.4.12.3 Imunoexpressões de TGF-b1 ativo e TGF-β1 latente 72

4.4.12.4 Análise da imunoexpressão de c-MPL 73

4.4.13 Extração e avaliação da qualidade do DNA genômico de sangue periférico 74

4.4.14 Quantificação dos alelos (allele burden) JAK2V617F 74

4.4.15 Detecção das mutações W515K e W515L no gene MPL nos pacientes negativos para a mutação JAK2V617F 75

4.4.16 Amplificação e sequenciamento do gene CALR 76

4.4.17 Análises Estatísticas 77

5 RESULTADOS 79

5.1 Características gerais, clínicas e hematológicas dos pacientes com MFP, MFPTE e TE e controles 79

5.2 Avaliação do prognóstico dos pacientes com MFP 83

5.2.1 Correlação entre carga alélica da mutação JAK2V617F e risco DIPSS-Plus em pacientes com MFP 84

5.3 Pacientes com cariótipo alterado 84

5.4 Comparações entre as concentrações dos marcadores plasmáticos de angiogênese (TGF-β1, VEGFA e FGF2) nos pacientes com MFP, MFPTE e TE e nos seus respectivos controles 85

5.5 Comparações entre as expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA*, *FGF2* e de *SMADs 1* a *7* e de miRNAs 193a-5p, 369-5p, 542-5p, 590-3p e 590-5p nos pacientes com MFP, MFPTE e TE e nos seus respectivos controles 87

5.6 Modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e expressões gênicas (RNAm e proteína) de *TGF-β1*, *VEGFA* e *FGF2*, RNAm de *SMADs 1* a *7* e expressões de miRNAs nos pacientes e controles 90

5.7 Modelos de correlações de Spearman entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e expressões gênicas (RNAm e proteína) de *VEGFA* e *FGF2*, RNAm de *SMADs* 1 a 7 e expressões de miRNAs nos pacientes e controles 93

5.8 Modelos de regressões lineares simples e multivariadas para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1 nos pacientes e controles segundo a expressão gênica de *VEGFA* e *FGF2*, e expressões de RNAm de *TGFB1* e *SMADs 1* a *7* 96

5.9 Expressão gênica (RNAm e proteína) de TGF-β1 em pacientes segundo a intensidade de angiogênese 101

5.10 Imunoexpressões de CD34, TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL nas biópsias de medula óssea dos pacientes com MFP, MFPTE e TE.....102

5.11 Associação da carga alélica da mutação *JAK2V617F* às expressões gênicas de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2*, às expressões de RNAm de *SMADs* e de microRNAs, e aos dados hematológicos dos pacientes com MFP, MFPTE e TE.....105

5.12 Frequências das mutações *W515K/L* no gene *MPL* 107

5.13 Frequências de mutações no gene *CALR* nos pacientes negativos para as mutações *JAK2V617F* e *MPLW515K/L* 107

5.14 Comparações dos dados hematológicos e das expressões gênicas de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* nos pacientes com MFP, MFPTE e TE de acordo a presença das mutações *JAK2V617F* ou *CALR*.....109

6 DISCUSSÃO 111

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 124

ANEXOS 148

ANEXO A – Informações para os Membros da Banca Julgadora de Doutorado .149

ANEXO B - Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.....150

ANEXO C - Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo.....152

ANEXO D - Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Pontifícia Universidade Católica, campus Sorocaba.....154

ANEXO E - Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo, referente ao adendo para pesquisa de mutações no gene *CALR*.....157

ANEXO F – Currículo Lattes 160

ANEXO G - Ficha do Aluno.....170

ANEXO H – Artigo publicado no periódico *Blood Cells, Molecules and Diseases* 174

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) crônicas cromossomo Philadelphia (Ph) negativo são doenças hematológicas clonais resultantes de mutação adquirida na célula-tronco hematopoiética, caracterizadas por aumento da proliferação de uma ou mais linhagens mielóides, com manutenção da maturação eficaz (Spivak, 2004; Kralovics, 2012).

As características básicas das três principais NMPs são: aumento da massa eritrocitária na policitemia vera (PV), fibrose medular na mielofibrose (MF) e plaquetose acentuada na trombocitemia essencial (TE). Essas NMPs apresentam diversas manifestações clínicas em comum, tais como esplenomegalia decorrente da hematopoiese extramedular, probabilidade de cursar com hipercelularidade na medula óssea, alto risco de hemorragia e complicações trombóticas, e a possibilidade, durante a evolução, de se transformarem em leucemia mielóide aguda (LMA) (Spivak e Silver, 2008; Kralovics, 2012).

A angiogênese possui importante papel em diversas doenças hematológicas, inclusive nas NMPs (Lundberg *et al.*, 2000; Wróbel *et al.*, 2003; Kvasnicka e Thiele, 2004; Panteli *et al.*, 2004; Alonci *et al.*, 2008; Carmeliet e Jain, 2011). Trata-se de um processo crucial para o crescimento e a metástase do tumor, visto que os novos vasos suplementam as células tumorais com nutrientes e oxigênio e garantem a drenagem eficiente de metabólitos (Folkman, 1990; Kaafarani *et al.*, 2009).

Dentre as várias citocinas e fatores de crescimento que modulam a angiogênese, os principais são o fator de transformação do crescimento (TGF)-β1, o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (Massagué, Blain e Lo, 2000; Ferrara, 2004), o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF2/ bFGF) e o fator induzido por hipóxia (HIF)-1 (Folkman, 1992; Polverini, 1995). Além disso, há crescentes evidências de que a angiogênese seja regulada por mecanismos epigenéticos, particularmente por microRNAs (miRNAs) (Buysschaert *et al.*, 2008).

A via de sinalizaçãodoTGF-β é altamente regulada por fatores especializados, muitos dos quais se encontram alterados em cânceres humanos (Massagué, Seoane e Wotton, 2005). A sinalização dos ligantes de TGF-β1 ao núcleo

é mediada por transdutores de sinais denominados *SMADs*, que ativam ou reprimem a transcrição, regulando a expressão do gene alvo (Heldin, Miyazono e ten Dijke, 1997; Attisano e Wrana, 1998; Wrana, 2000), inclusive do próprio *TGFB1* (Shi e Massagué, 2003; Akhurst, 2012).

Vários estudos têm sido realizados a fim de melhorar a compreensão da angiogênese nas NMPs, sendo necessário elucidar as interações entre fatores co-expressos em tecidos em que esteja ocorrendo angiogênese a nível endotelial (Pardali e Moustakas, 2007; Ferrari *et al.*, 2009) e os mecanismos de regulação gênica pós-transcricional (Chang e Hla, 2011), pois ainda há informações limitadas disponíveis em relação à função e genes alvo de miRNAs nas células endoteliais (Kuehbacher, Urbich e Dimmeler, 2008).

Com esse estudo, pretendemos esclarecer o papel do TGF-β1 na angiogênese na MF e TE, avaliando possíveis interações entre as expressões de RNAm de *SMADs* e de miRNAs e a expressão gênica de TGF-β1, identificando seus papéis na angiogênese, além de compreender a cooperação entre TGF-β1, VEGFA e FGF2 nesse processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neoplasias mieloproliferativas

William Dameshek, em 1951, foi o primeiro a reconhecer que as NMPs deveriam ser classificadas como um conjunto de doenças fenotipicamente relacionadas, apesar de terem sido reconhecidas como entidades clínicas distintas ao longo do século anterior (Levine e Gilliland, 2008; Tefferi, 2008).

Classicamente conhecidas como doenças mieloproliferativas crônicas, esse grupo de doenças foi renomeado para NMPs na Classificação de Tumores dos Tecidos Hematopoiético e Linfóide pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008, ressaltando seu caráter clonal. São atualmente divididas em oito entidades patológicas: leucemia mielóide crônica (LMC) BCR-ABL1 positiva, decorrente da translocação do cromossomo Ph; PV; MF; TE; leucemia neutrofílica crônica; leucemia eosinofílica crônica; mastocitose; e neoplasias mieloproliferativas inclassificáveis (**Figura 1**) (Spivak e Silver, 2008; Tefferi e Vardiman, 2008a; Vardiman *et al.*, 2009).

As NMPs cromossomo Ph negativo são doenças hematológicas clonais, originadas devido à aquisição de uma mutação na célula-tronco hematopoiética, e são caracterizadas por aumento da proliferação de uma ou mais linhagens mielóides, seja eritróide, eosinofílica, granulocítica, megacariocítica ou mastocítica; com acúmulo de células mielóides e manutenção da maturação eficaz (Spivak, 2004; Kralovics, 2012).

A PV, a MF e a TE apresentam características biológicas semelhantes, tais como a origem em uma célula progenitora hematopoiética pluripotente; dominância do progenitor clonal sobre o progenitor de células-tronco hematopoiéticas e hipersensibilidade à eritropoetina (EPO), interleucina (IL)-3, fator de célula-tronco (SCF), fator de crescimento similar à insulina (IGF)-1, fator estimulante de colônias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF) e trombopoetina (TPO), o que leva ao crescimento independente de citocinas de progenitores eritróides *in vitro* (Spivak e Silver, 2008). Essa hipersensibilidade a diferentes fatores de crescimento levou à sugestão de que a anomalia primária nas NMPs poderia ser em um componente de

sinalização celular subsequente a múltiplos receptores de fatores de crescimento (Hinshelwood, Bench e Green, 1997).

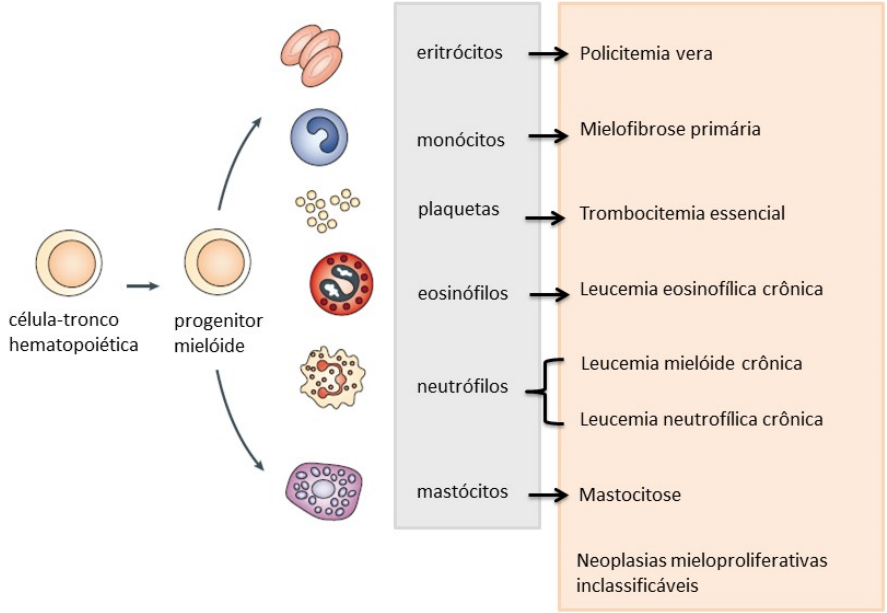

Figura 1 - Classificação das neoplasias mieloproliferativas crônicas.
As diferentes doenças podem ser classificadas pela célula mielóide terminalmente diferenciada predominante envolvida na doença, e para cada célula terminalmente diferenciada há uma distinta neoplasia mieloproliferativa crônica. Fonte: Adaptado de Levine *et al.*, 2007; Spivak e Silver, 2008; Tefferi e Vardiman, 2008.

2.1.1 Mutação JAK2V617F

Em 2005, foi demonstrado que pacientes com NMPs apresentavam uma mutação em um domínio auto-inibitório de uma proteína tirosinoquinase citoplasmática da família Janus quinase (JAK), a JAK2, (Baxter *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005), que possui papel chave na transdução de sinal de múltiplos receptores de fatores de crescimento hematopoiéticos (Komura *et al.*, 2003). Tal fato esclareceu alguns aspectos da patogênese das principais NMPs, melhorando a especificidade do diagnóstico, e levando ao aumento do número de pesquisas relacionadas a doenças mieloproliferativas (Chauffaille, 2010).

A mutação somática *V617F* no exon 14 do gene *JAK2* refere-se à substituição de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 1849 do cDNA, acarretando a troca

de uma valina altamente conservada por uma fenilalanina no códon 617 (Baxter *et al.*, 2005; James, Ugo, Le Couédic*, et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005). Essa mutação está presente em cerca de 96% dos pacientes com PV, 65% daqueles com MF e 55% dos portadores de TE (Tefferi e Vainchenker, 2011). No Brasil, a frequência dessa mutação em pacientes com PV permanece a mesma, porém se apresenta em apenas 43-56% dos pacientes com MF e em 28% ou 47% dos pacientes com TE (Dos Santos *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2014).

É intrigante como uma única mutação pode originar três fenótipos diferentes, porém existem algumas hipóteses para explicar como a mutação *JAK2V617F* pode originar a PV, a MF ou a TE. Algumas hipóteses se baseiam na idéia de que os diferentes fenótipos são originados em decorrência da mutação *JAK2V617F*, enquanto outras indicam que o fenótipo dessas doenças é independente dessa mutação.

Num efeito dependente de *JAK2*, células homozigotas para a mutação *JAK2V617F* seriam responsáveis pelo desenvolvimento de um fenótipo eritróide, enquanto células heterozigotas originariam a TE. A carga alélica (proporção de mutantes para o tipo selvagem) da mutação *JAK2V617F* também parece modular as manifestações fenotípicas das NMPs: taxas elevadas favorecem o desenvolvimento do fenótipo de PV e taxas baixas induzem o fenótipo de TE (Lippert *et al.*, 2006; Tiedt *et al.*, 2008; Levine, 2009).

Num efeito independente de *JAK2*, mutações somáticas ou lesões epigenéticas poderiam agir sinergicamente com a *JAK2* na patogênese dessas doenças (Levine, 2009). Recentemente, foi demonstrado que a ordem de aparecimento das mutações impacta nas características clínicas e biológicas da doença. Pacientes nos quais a mutação *JAK2V617F* foi adquirida anteriormente à mutação no gene *TET2* apresentam maior probabilidade de desenvolverem PV do que TE. Além disso, esses pacientes mostram sinais de doença aproximadamente 10 anos antes, têm maior risco de eventos trombóticos, e são mais responsivos à terapia com inibidor de JAK do que aqueles em que a mutação inicial é a *TET2* (Ortmann et al., 2015). Além disso, variações genéticas da linhagem germinativa podem ser implicadas na patogênese diferencial dessas NMPs (Levine, 2009).

O gene *JAK2* está localizado no cromossomo 9p24 e codifica uma proteína com 1132 aminoácidos (Pritchard *et al.*, 1992;Saltzman *et al.*,1998), membro de uma

grande família de tirosinoquinases envolvidas na sinalização de receptores de citocinas, a qual inclui JAK1, JAK3 e não receptor de proteína tirosinoquinase (TYK2) (Schindler e Darnell, 1995). Essas proteínas possuem papel fundamental na transdução de sinal de múltiplos fatores de crescimento hematopoiéticos (Komura *et al.*, 2003; Ugo *et al.*, 2004) e se associam a receptores de citocinas para ativar os membros da família de fatores de transcrição de transdução de sinal e ativadores de transcrição (STATs), que se ligam a promotores de genes específicos, reguladores da proliferação e diferenciação (**Figura 2**) (Schindler e Darnell, 1995).

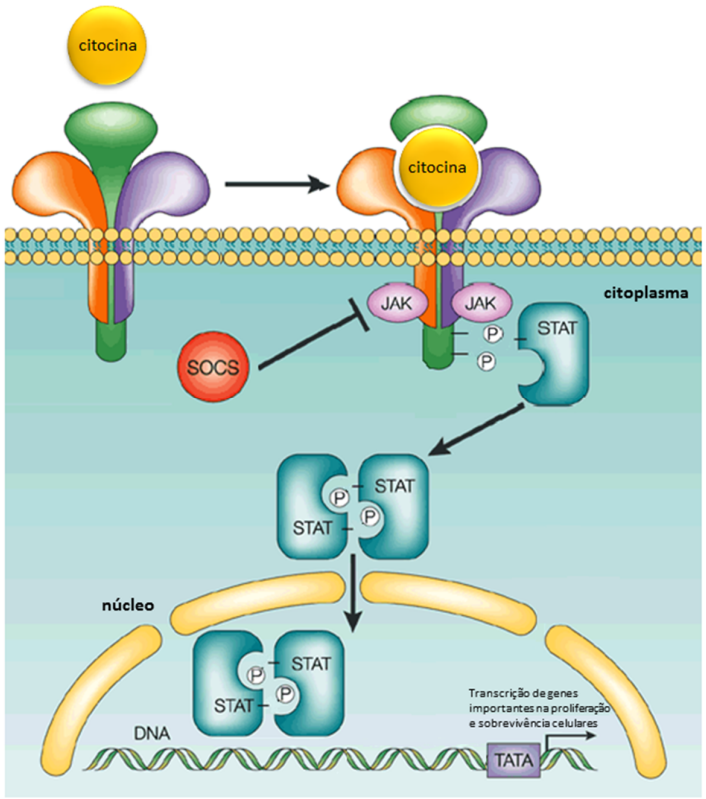

Figura 2 - Via de sinalização JAK-STAT.
A ligação da citocina ao receptor induz a ativação das JAKs, que fosforilam substratos celulares, permitindo o recrutamento de proteínas STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição) para fosforilar o receptor pelo seu domínio de homologia Scr (SH2), o qual, por sua vez, é também fosforilado. As proteínas STAT podem dimerizar, translocar para o núcleo e se ligar ao DNA. O TATA box permite a ligação da maquinaria basal de transcrição. SOCS (Supressores da sinalização de citocinas) regulam negativamente a sinalização JAK-STAT. Fonte: Adaptado de Leonard, 2001.

As JAK apresentam sete regiões de similaridade de sequência entre os membros da família, denominados domínios de homologia JAK (JH). O domínio JH1, localizado no C-terminal, apresenta atividade quinase catalítica (Saharinen, Takaluoma e Silvennoinen, 2000). O JH2, adjacente ao JH1, possui homologia significativa com esse domínio, porém, não possui atividade catalítica, sendo, portanto, denominado pseudoquinase (Wilks *et al.*, 1991). Evidências sugerem que o JH2 esteja envolvido na auto-inibição da atividade da JAK2 (Saharinen, Takaluoma e Silvennoinen, 2000), e o domínio JH7, localizado no N-terminal, é essencial para a associação da JAK2 a receptores de citocinas (Chen *et al.*, 1997).

A mutação *JAK2V617F* ocorre no domínio JH2 (**Figura 3**), e impede a atividade quinase-regulatória negativa mediada pelo domínio pseudoquinase. A *JAK2V617F* mutante permanece constutivamente ativada independentemente do ligante e desenvolve hipersensibilidade às citocinas. Desse modo, esse estado é diferente das condições normais em que a JAK2 somente é ativada após a dimerização ou oligomerização dos receptores de citocinas que se ligam aos seus respectivos ligantes (Baxter *et al.*, 2005; James, Ugo, Le Couédic*, et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Baker, Rane e Reddy, 2007).

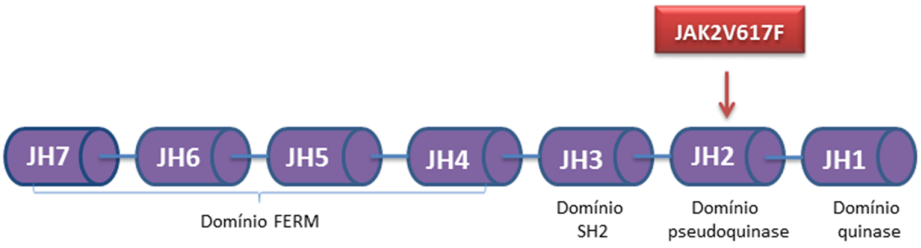

Figura 3 - Estrutura da proteína Janus Quinase 2 (JAK2) - Domínios de Homologia.

A proteína JAK2 apresenta sete domínios bem conservados, denominados domínios de homologia JAK (JH1-JH7). O domínio JH1 é o domínio tirosino quinase. O domínio JH2 apresenta grande homologia com JH1, mas não possui determinados aminoácidos requeridos para a atividade quinase, sendo, portanto, o domínio pseudoquinase. A mutação *JAK2V617F* ocorre no domínio JH2. A JAK2 contém quatro domínios funcionais maiores: o domínio tirosinoquinase (JH1) fosforila proteínas alvo; o domínio pseudoquinase (JH2) regula a atividade do JH1, o domínio de homologia Src 2 (SH2) está envolvido em interações com diversos intermediários de sinalização; enquanto o domínio FERM medeia interações com receptores. Fonte: Adaptado de James, Ugo, Casadevall*, et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2007.

Ao ser expressa em células hematopoiéticas, a *JAK2V617F* ativa várias vias de sinalização importantes para a proliferação e sobrevivência, incluindo STAT3, STAT5, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), quinase reguladora de sinal extracelular (ERK) e a via fosfatidilinositol 3- quinase- proteína quinase B [(PI3K)-AKT] (James, Ugo, Casadevall*, et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Quintás-Cardama *et al.*, 2011). Após a fosforilação pela JAK2, monômeros STAT dimerizam e translocam para o núcleo, onde modulam a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e sobrevivência, incluindo a proteína anti-apoptótica *B-cell linfoma-x* [Linfoma de grandes células B (Bcl-x)], expressa em precursores eritróides de pacientes com PV (Silva *et al.*, 1998).

2.1.2 Mutações W515K/L no gene MPL e outras mutações

O gene *MPL* (Leucemia mieloproliferativa), localizado no cromossomo 1p34, possui 12 exons distribuídos em 17kb de DNA (Le Coniat *et al.*, 1989). Esse gene codifica o receptor de TPO, um fator de crescimento hematopoiético que regula a produção de progenitores hematopoiéticos multipotentes e plaquetas (Mignotte *et al.*, 1994). O mecanismo pelo qual a TPO ativa seu receptor parece ser semelhante ao de outras citocinas hematopoiéticas, que se ligam e induzem a homodimerização do receptor.

Mutações somáticas com ganho de função no exon 10, aminoácido 515 do gene *MPL*, resultam na substituição de um triptofano (W) por uma leucina (L), lisina (K), asparagina (D) ou alanina (A) (Pikman *et al.*, 2006; Beer *et al.*, 2008; Chaligné *et al.*, 2008; Boyd *et al.*, 2010), O aminoácido 515 é localizado num trecho de cinco aminoácidos ([K/R]WQFP) encontrados no citoplasma logo após o domínio transmembrana. Esses aminoácidos possuem papel principal na conformação do citosol do receptor de MPL (cMPL) e previnem sua ativação espontânea (Staerk *et al.*, 2006; Pecquet *et al.*, 2010).

Em 2006, foram identificados ganhos de função no gene *MPL* em quatro de 45 pacientes com MF que não apresentavam a mutação *JAK2V617F* (Pikman *et al.*, 2006).Posteriormente,essas mutações no gene *MPL* foram também encontradas em

pacientes portadores da mutação *JAK2V617F* (Hoffman e Rondelli, 2007). As mutações *W515K* e *W515L*, assim como a *JAK2V617F*, induzem a ativação constitutiva da sinalização pela via JAK-STAT independente de citocinas (Pardanani *et al.*, 2006).

Outras mutações somáticas que influenciam diversas funções celulares foram descobertas e implicadas na patogênese das NMPs, embora apareçam com menor frequência. Dentre essas estão as mutações na proteína adaptadora LNK [Homologia 2-B3 de Scr (SH2B3)], que resultam na perda de função da proteína, responsável por regular negativamente a sinalização de EPO e TPO por meio da inibição de JAK2 (Lasho, Pardanani e Tefferi, 2010; Oh *et al.*, 2010); e mutações nos genes de SOCS, que regulam negativamente a via JAK-STAT (Krebs e Hilton, 2000). Além disso, mutações em genes que parecem afetar o epigenoma dos pacientes com NMPs foram relatadas, incluindo mutações nos genes *TET2*, *IDH1/2*, *EZH2*, e *ASXL* (Abdel-Wahab *et al.*, 2010).

2.1.3 Mutações no gene CALR

Recentemente, dois estudos independentes identificaram mutações no exon 9 do gene *CALR* em 70% e 84% dos pacientes com MF e TE negativos para as mutações *JAK2V617F* e *MPL W515K/L*, fornecendo fortes evidências de que mutações nesse gene apresentam importante papel na patogênese dessas doenças (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013).

Essas mutações são inserções e deleções que levam a um *frameshift* responsável por alterar a parte C-terminal da proteína (Klampfl *et al.*, 2013), resultando na formação de um peptídeo com um novo C-terminal em uma região de retenção do retículo endoplasmático. Apesar dos efeitos fisiológicos dessas alterações não terem sido esclarecidos ainda, os primeiros estudos sugerem uma implicação crítica na fosforilação de STAT5 (Klampfl *et al.*, 2013).

O gene *CALR* codifica a calreticulina, uma proteína com múltiplas funções, localizada primariamente no lúmen do retículo endoplasmático, onde realiza funções de chaperona. Essa proteína tem importante função na homeostase do cálcio, e provavelmente possui um papel na regulação da transcrição, visto ser também

encontrada no núcleo celular (Burns *et al.*, 1994). Os genes alvo da calreticulina ainda não são conhecidos, porém há evidências de seu envolvimento na apoptose e na regulação da sobrevivência celular em células cancerígenas por meio da promoção de atividade antitumoral de macrófagos (Chao *et al.*, 2010).

As mutações no gene *CALR* estão presentes em 20 a 25% de todos os pacientes com MF ou TE (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013). Mais de 50 tipos de mutações foram detectadas nesse gene, mas a variante tipo 1 (p.L367fs*46), resultante de uma deleção de 52pb e a variante tipo 2 (p.K385fs*47), resultante de uma inserção de 5 pares de bases TTGTC, são os tipos mais frequentes, sendo no geral encontradas em mais de 80% dos pacientes com mutações no gene *CALR* (Cazzola e Kralovics, 2014).

A identificação e a avaliação dessas mutações específicas das NMPs podem ser importantes para diagnóstico, prognóstico e monitoramento da resposta ao tratamento. Desde a descoberta das mutações no gene *CALR*, diversos estudos correlacionaram essas mutações com dados clínicos e prognóstico nas NMPs. Interessantemente, foi descrita a presença de mutações *CALR* em dois pacientes com PV negativos para mutações *JAK2V617F* e *JAK2* exon 12 (Broséus, Park*, et al.*, 2014). A coexistência das mutações *JAK2V617F* e *CALR* foi encontrada em raros casos de anemia refratária com sideroblastos em anel associada com marcada trombocitose (Broséus, Lippert*, et al.*, 2014), PV (Xu *et al.*, 2014), MF (Tefferi, Lasho, Finke, Knudson*, et al.*, 2014; Zamora *et al.*, 2015) e TE (Lundberg *et al.*, 2014; McGaffin *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014).

2.2 Mielofibrose primária

A MF foi inicialmente descrita e caracterizada por Gustav Heuck em 1879, um médico alemão que notou a presença de fibrose medular e hematopoiese extramedular alguns pacientes(Levine e Gilliland, 2008; Tefferi, 2008). Anteriormente denominada mielofibrose crônica idiopática, metaplasia mielóide agnogênica e mielofibrose com metaplasia mielóide (Mesa,Verstovsek*, et al.*, 2007), caracteriza-se por mieloproliferação clonal associada à fibrose reativa na medula óssea,

osteosclerose, angiogênese, hematopoiese extramedular e expressão anormal de citocinas (Hoffman e Rondelli, 2007; Tefferi e Vainchenker, 2011).

2.2.1 Epidemiologia

A MF de ocorrência aparentemente *de novo* é denominada mielofibrose primária (MFP), enquanto ao se desenvolver devido à progressão da PV ou da TE, é denominada MF-pós PV (MFPPV) e MF-pós TE (MFPTE), respectivamente (Mesa, Verstovsek*, et al.*, 2007). A taxa de ocorrência é de 10 a 20% após 15 a 20 anos do surgimento da MFP (Cervantes *et al.*, 2002). Nessas doenças há intensidade de pancitopenia variável e acúmulo de blastos na medula óssea e sangue periférico (Kralovics, 2012).

Numa revisão sistemática extensa a respeito da incidência e da prevalência das NMPs mundialmente, as taxas de incidência da MF variaram de 0,22 a 0,99 a cada 100.000 pessoas, com taxa de incidência anual combinada de 0,47 a cada 100.000. A prevalência variou de 1,76 a 4,05 a cada 100.000 (Titmarsh *et al.*, 2014).

A MF predomina no sexo masculino (62%), e a maioria dos pacientes tem mais de 60 anos de idade ao diagnóstico, com idade média de 66 anos, e cerca de 5 a 17% são diagnosticados antes de 40 a 50 anos (Mesa *et al.*, 1999; Mesa *et al.*, 2005).

O prognóstico pode variar entre os indivíduos devido a diferenças nas características de agressividade da doença e na idade do paciente ao diagnóstico (Patnaik *et al.*, 2010). A sobrevida se relaciona à presença de comorbidades e grau de fibrose medular (Lekovic *et al.*, 2014), e as características frequentemente relacionadas à sobrevida são: a idade, o grau de anemia, o número de leucócitos e número de blastos no sangue periférico (Barosi e Hoffman, 2005). A expectativa de vida média dos pacientes com MF é estimada em 5 a 7 anos, podendo chegar a 15 anos em pacientes jovens com bom prognóstico (Cervantes *et al.*, 2009). As causas de morte incluem a transformação em LMA, infecções, hemorragias, trombose, falência cardíaca, falência hepática, tumores sólidos, falha respiratória e hipertensão portal (Cervantes *et al.*, 1997).

Ao diagnóstico, a probabilidade de sobrevida pode ser avaliada pelo Sistema de Escore de Prognóstico Internacional (IPSS) (Cervantes *et al.*, 2009), e o Sistema

de Escore Prognóstico Internacional Dinâmico (DIPSS-Plus) pode ser usado a qualquer momento durante o curso da doença (Passamonti *et al.*, 2010). O DIPSS-Plus é um sistema de pontuação que avalia oito fatores de risco independentes (**Tabela 1**), usado para estratificar os pacientes nas categorias de risco baixo (ausência dos fatores de risco), intermediário 1 (presença de um fator de risco), intermediário 2 (presença de 2 ou 3 fatores de risco) ou alto (presença de 4 fatores de risco ou mais). Cada categoria de risco está associada a diferente tempo médio de sobrevida e conduta de tratamento (**Tabela 2**) (Gangat *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Fatores de risco para mielofibrose primária segundo a classificação DIPPS-Plus

Idade superior a 65 anos
Hemoglobina < 10 g/dL
Leucócitos > 25 × 10^9/L
Blastos circulantes ≥ 1%
Presença de sintomas constitucionais*
Presença de cariótipo desfavorável**
Plaquetas < 100 × 10^9/L
Necessidade de transfusão de eritrócitos

*São considerados sintomas constitucionais a presença de febre sem causa determinada, perda de peso maior que 10% em referência ao valor basal e suores excessivos por período maior que 1 mês; **Considera-se como cariótipo desfavorável cariótipo complexo ou único ou 2 anormalidades dentre as seguintes: 8, −7/7q−, i(17q), inv(3), −5/5q− 12p−, ou rearranjo 11q23. Adaptado de Tefferi e Vainchenker, 2011.

Tabela 2 - Categorias de risco segundo a DIPSS-plus para o prognóstico da mielofibrose primária, média de sobrevida e conduta empregada em cada caso

Categorias de risco segundo DIPSS-plus	Média de sobrevida	Conduta empregada
Baixo (sem fatores de risco)	15,4 anos	Observação ou tratamento convencional*
Intermediário 1 (1 fator de risco)	6,5 anos	Observação ou tratamento convencional* ou experimental
Intermediário 2 (2 ou 3 fatores de risco)	2,9 anos	Transplante alogênico de células-tronco ou tratamento experimental
Alto (≥ 4 fatores de risco)	1,3 anos	Transplante alogênico de células-tronco ou tratamento experimental

*Preparações de andrógenos ou talidomida associada à prednisona para anemia; hidroxicarbamida para esplenomegalia.
Fonte: (Gangat *et al.*, 2011).

2.2.2 Aspectos clínicos e laboratoriais

A fase inicial da MF pode não ser detectada em muitos indivíduos, porém é caracterizada pela proliferação de granulócitos e megacariócitos, ordinariamente com aumento do número de plaquetas (Mesa, 2010). A doença é geralmente detectada em exames de rotina, devido à esplenomegalia e hemograma anormais.

Os pacientes sintomáticos apresentam anemia leve a moderada, esplenomegalia progressiva devido à hematopoiese extramedular, e anisocitose com presença de dacriócitos no sangue periférico (Tefferi, 2000; Hoffman e Rondelli, 2007). Os sintomas clínicos são decorrentes da anemia (fraqueza, cansaço, palpitações e dispnéia), esplenomegalia (desconforto ou dor abdominal), estado hipermetabólico (perda de peso, sudorese noturna ou febre), sangramentos, prurido, alterações ósseas, hipertensão portal e anormalidades imunológicas (Tefferi e Gilliland, 2006; Mesa, Verstovsek*, et al.*, 2007).

A MF pode apresentar duas fases distintas: pré-fibrótica e fibrótica ou esclerosante. Na fase inicial, denominada pré-fibrótica, a medula óssea não exibe aumento significativo das fibras reticulínicas ou colágenas, mas pode apresentar-se hipercelular. Na evolução para a fase fibrótica, o tecido hematopoetico é substituído por fibras colagênicas e reticulínicas, levando a fibrose plenamente estabelecida na medula óssea (Mesa *et al.*, 2005; Tefferi *et al.*, 2007; Tefferi *et al.*, 2008). A maioria dos casos de MF é diagnosticada na fase fibrótica, que apresenta características clínicas e laboratoriais indistinguíveis da MFPPV e MFPTE, incluindo anormalidades citogenéticas e risco aumentado de transformação para fase blástica semelhantes aos da LMC e da LMA (Mesa, 2010).

Os pacientes com MF apresentam altas concentrações de citocinas inflamatórias (Panteli *et al.*, 2005), o que contribui para o fenótipo clínico, inclusive angiogênese, hematopoiese extramedular, sintomas constitucionais (fadiga, prurido, desconforto abdominal, saciedade precoce, suores noturnos e intolerância ao exercício) e caquexia (Barosi e Hoffman, 2005; Tefferi e Gilliland, 2005; Tefferi *et al.*, 2007).

As altas concentrações de IL-6, por exemplo, refletem a ativação secundária do sistema imune (Panteli *et al.*, 2005), de maneira que a redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias melhora os sintomas constitucionais e a esplenomegalia causados pela MF (Verstovsek *et al.*, 2010). A IL-8, por sua vez, exerce efeito no

microambiente tumoral (Waugh e Wilson, 2008), e como suas concentrações estão aumentadas em indivíduos com MF, é provável que, juntamente com seus receptores e outras citocinas, esteja relacionada à produção de megacariócitos anormais. A liberação intramedular de IL-8 também contribui para a angiogênese, comprometimento megacariocítico, proliferação de célula progenitora mielóide e diferenciação (Emadi *et al.*, 2005).

2.2.3 Critérios diagnósticos

De acordo com a classificação da OMS de 2008, o indivíduo deve apresentar todos os três critérios maiores e pelo menos dois dos quatro critérios menores para que seja diagnosticada a MFP. Essa classificação incluiu os aspectos histológicos como fundamentais e os combinou com achados moleculares (**Tabela 3**).

A medula deve apresentar-se hipercelular (fase pré-fibrótica) ou com fibrose reticulínica ou colagênica (fase fibrótica), e com proliferação de megacariócitos anormais e atípicos (pleomórficos, de tamanhos variados), formando agrupamentos adjacentes aos seios das trabéculas ósseas (Tefferi *et al.*, 2007; Tefferi e Vardiman, 2008).

Como a mutação *JAK2V617F* é positiva em cerca de 50% dos pacientes com MFP, e as mutações *MPL W515K/L* são encontradas em apenas poucos pacientes (Baxter *et al.*, 2005; Pardanani *et al.*, 2006; Pikman *et al.*, 2006; Tefferi *et al.*, 2007; Tefferi e Vardiman, 2008), a ausência desses marcadores não exclui a MFP.

Dessa maneira, faz-se necessário excluir a possibilidade de fibrose medular reativa, que pode ocorrer em doenças granulomatosas crônicas, doenças inflamatórias, lúpus eritematoso sistêmico, dentre outras. A fibrose também pode aparecer em outras NMPs, tais como LMC, PV e TE, portanto, os aspectos clínicos e laboratoriais devem ser considerados na elucidação do diagnóstico, e deve-se realizar a pesquisa de BCR-ABL1 para a exclusão de LMC (Tefferi *et al.*, 2007; Tefferi e Vardiman, 2008).

Tabela 3 - Critérios diagnósticos para mielofibrose primária e mielofibrose pós-trombocitemia essencial

		Mielofibrose primária*		Mielofibrose pós-trombocitemia essencial**
Critérios maiores	**1**	Proliferação megacariocítica e atipia acompanhada de fibrose colagênica ou reticulínea[a]	**1**	Documentação de diagnóstico prévio de TE como definido pelo critério da OMS
	2	Não atender os critérios da OMS para LMC, PV, SMD ou outra neoplasia mieloide	**2**	Fibrose medular grau 2-3 (em escala 0-3) ou grau 3-4 (escala 0-4)[b]
	3	Presença de JAKV617F ou outro marcador clonal OU ausência de evidência de fibrose medular reativa.		
Critérios menores	**1**	Leucoeritroblastose	**1**	Anemia acompanhada de decréscimo de pelo menos 2 g/dL na concentração de hemoglobina basal
	2	Lactato desidrogenase sérica aumentada	**2**	Quadro de eritroblastose no sangue periférico
	3	Anemia	**3**	Esplenomegalia[c]
	4	Esplenomegalia palpável	**4**	Lactato desidrogenase aumentada
			5	Desenvolvimento de um ou mais sintomas constitucionais[d]

Os diagnósticos de mielofibrose primária e de mielofibrose-TE requerem a presença de todos os critérios maiores e pelo menos dois critérios menores.
*Critérios da OMS, 2008; **Critérios do IWG-MRT, 2008.
[a] Na ausência de fibrose reticulínea, as alterações megacariocíticas devem estar acompanhadas por aumento da celularidade da medula óssea e da proliferação granulocítica, além de eritropoese diminuída.
[b] Grau 2-3 de acordo com a classificação europeia (Thiele *et al.*, 2005). Grau 3-4 de acordo com a classificação padrão (Manoharan, Horsley e Pitney, 1979).
[c] Definida pelo aumento de pelo menos 5 cm na esplenomegalia palpável pré-existente ou pelo aparecimento de esplenomegalia palpável recente.
[d] Sintomas constitucionais: perda de peso >10% no período de 6 meses, suor noturno e febre não esclarecida (>37,5 ºC).
LMC: Leucemia mieloide crônica, PV: policitemia vera; SMD: síndrome mielodisplásica; TE: trombocitemia essencial.
Adaptado de Spivak e Silver, 2008; Tefferi e Vardiman, 2008.

2.2.4 Fisiopatologia

A MF é ocasionada pela transformação neoplásica da célula-tronco hematopoiética. A mieloproliferação clonal é acompanhada por alterações secundárias no estroma da medula óssea e no perfil de citocinas plasmáticas (Tefferi, 2005; Tefferi e Gilliland, 2005), levando à hiperplasia intensa de megacariócitos, que liberam citocinas promotoras de fibrose medular, e de monócitos, que produzem grandes quantidades de TGF-β e IL-1, que são mitógenos de fibroblastos indutores da adesão de proteínas da matriz extracelular (Barosi e Hoffman, 2005; Hoffman e Rondelli, 2007). Além disso, concentrações elevadas de FGF2, de TGF-β1, de VEGFA e de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) foram relacionadas aos processos de fibrose medular e angiogênese (Le Bousse-Kerdilès e Martyré, 1999; Hasselbalch *et al.*, 2011).

O TGF-β1 possui papel fundamental no desenvolvimento da fibrose progressiva na medula óssea. Além de aumentar a fibronectina e colágenos tipos I, III e IV, é responsável por reduzir a síntese de várias enzimas colagenase-*like* que degradam a matriz extracelular e estimulam a síntese de inibidores de protease, como por exemplo, o inibidor do ativador tecidual do plasminogênio-1.

A inflamação crônica evidente na MF foi demonstrada pelo aumento das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e desregulação de genes inflamatórios a nível transcricional (Skov *et al.*, 2012). Altas concentrações de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF), IL-6 e interferon (IFN)-γ, foram associadas aos sintomas constitucionais característicos da MF, como fadiga, perda de peso, suores noturnos e febre (Tefferi *et al.*, 2011).

A desregulação da sinalização da via JAK-STAT é um dos mecanismos centrais da fisiopatologia da MF (Quintás-Cardama *et al.*, 2011). As mutações *JAK2V617F* e *MPL W515K/L* levam à desregulação da via JAK-STAT por meio da sua ativação constitutiva independente de citocinas (Baxter *et al.*, 2005; James, Ugo, Casadevall*, et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Pardanani *et al.*, 2006; Baker, Rane e Reddy, 2007), e estão presentes em cerca de 50% e 9% dos pacientes com MF, respectivamente (Pikman *et al.*, 2006; Monte-Mór *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2011; Tefferi e Vainchenker, 2011). Além disso, 70% dos pacientes com MF negativos para essas mutações apresentam mutação no gene *CALR*, que aparentemente possui papel crítico na fosforilação de STAT5 (Klampfl *et al.*, 2013).

Como não se podem considerar as mutações *JAK2V617F* e *MPL W515K/L* como específicas das NMPs, sugere-se que essas doenças sejam decorrentes de um acúmulo de uma combinação de lesões genéticas e de eventos epigenéticos (Hoffman e Rondelli, 2007; Tefferi, 2012).

Alterações citogenéticas são encontradas em cerca de 35% dos pacientes com MFP, a maior frequência dentre as NMPs. As alterações cromossômicas mais comuns incluem del(13q), del(20q), trissomia parcial do 1q, além de +8 e +9 (Bacher *et al.*, 2009). Alterações nos cromossomos 5 ou 7 geralmente se relacionam ao uso prévio de quimioterápicos para o tratamento de NMPs (Mesa *et al.*, 2005), enquanto a presença de cariótipos complexos ou com alterações que não sejam unicamente 20q- ou +9 foram relacionadas a menor sobrevida na MF (Rumi *et al.*, 2010).

2.2.5 Tratamento

O transplante de medula óssea é a única terapia potencialmente curativa para a MF. Os tratamentos convencionais visam aliviar os sintomas e prevenir a progressão da doença, porém aparentemente não prolongam a sobrevida dos pacientes. A hidroxiuréia (hidroxicarbamida) é empregada para o tratamento de diversos sintomas, incluindo a hepatoesplenomegalia, os sintomas constitucionais e a anemia. Outros tratamentos menos frequentemente usados, como EPO, talidomida, e IFN-α, mostraram-se eficazes em algumas populações, porém não são universalmente efetivos para reduzir os sintomas (Meier e Burton, 2014) e podem ser pouco tolerados (Mesa, 2009).

A descoberta da mutação *JAK2V617F* levou ao desenvolvimento de fármacos inibidores de JAK, sendo o ruxolitinibe (inibidor de JAK1 e JAK2) o primeiro aprovado pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos [F*ood and Drug Administration* (FDA)] para uso em pacientes com MF de riscos alto e intermediário-2 (Tefferi, 2012). Inibidores de JAK1/ JAK2 regulam negativamente as citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL1RA e IL-8, o que reduz os sintomas constitucionais (Tefferi *et al.*, 2011). Existem controvérsias sobre a importância dos inibidores de JAK. Alguns estudos afirmam que esses fármacos não revertem a fibrose medular nem induzem a remissão parcial ou completa da doença, e, portanto, não alteram a sobrevida dos pacientes (Tefferi, Litzow e Pardanani, 2011; Tefferi, 2012; Cervantes *et al.*, 2013). Um estudo recente, no entanto, mostrou melhora rápida e durável da esplenomegalia e dos sintomas associados à MF (COMFORT-I), além de ter associado esses inibidores com sobrevivência prolongada em comparação com placebo ou com a melhor terapia disponível (COMFORT-II) (Vannucchi *et al.*, 2015).

Evidências de que a angiogênese apresenta potencial papel no prognóstico e na fisiopatologia da MF levaram ao desenvolvimento de terapias direcionadas à inibição desse processo, como por exemplo, os inibidores de VEGFA (Arora, Mesa e Tefferi, 2004).

2.3 Trombocitemia essencial

A TE foi a última das NMPs a ser descrita, em 1934, quando Emil Epstein e Alfred Goedel reconheceram que pacientes que com trombocitose sem eritrocitose acentuada apresentavam uma síndrome clínica distinta (Levine e Gilliland, 2008; Tefferi, 2008). A TE é caracterizada por proliferação excessiva de megacariócitos e, principalmente, plaquetose acentuada (Fialkow *et al.*, 1981), com complicações vasculares, massa eritrocitária normal e sem fibrose medular proeminente, podendo haver hiperplasia medular (Finazzi e Harrison, 2005).

2.3.1 Epidemiologia

A incidência da TE é de 2,5 a cada 100 mil pessoas ao ano (Mesa *et al.*, 1999), e, mundialmente, essa frequência varia de 0,59 a 2,53 casos a cada 100 mil pessoas ao ano, enquanto a prevalência é de cerca de 24 a 30 casos/ 100 mil pessoas ao ano (Johansson, 2006; Ma *et al.*, 2008). Afeta predominantemente as mulheres (Passamonti *et al.*, 2004), e a idade média dos pacientes ao diagnóstico é de 60 anos (Finazzi e Harrison, 2005).

A expectativa de vida dos pacientes com TE é próxima à da população sem a doença, ao menos durante a primeira década do diagnóstico (Passamonti *et al.*, 2012). A sobrevida média é de 20 anos, mas em pacientes jovens pode chegar a 33 anos (Tefferi, Litzow e Pardanani, 2011). Os fatores de risco relacionados à sobrevida são idade avançada, leucocitose e trombocitose (Passamonti *et al.*, 2012; Tefferi *et al.*, 2013), com taxa de transformação leucêmica para 20 anos estimada em 5% (Barbui *et al.*, 2011).

2.3.2 Aspectos clínicos

A TE é a NMP com maior heterogeneidade em relação ao perfil clínico e a alterações celulares e moleculares, visto que um terço das mulheres com essa condição aparentemente apresenta hematopoiese policlonal (Antonioli *et al.*, 2008). A doença é caracterizada principalmente pela ocorrência de eventos trombo-hemorrágicos e pelo

número elevado de plaquetas, com hiperplasia de megacariócitos, embora haja alteração em outros setores medulares (Tefferi e Vardiman, 2008).

Geralmente a TE é identificada em exames de rotina, visto que cerca de 25% a 33% dos pacientes são sintomáticos. No entanto, os pacientes assintomáticos apresentam disfunção microvascular coronária na ausência de condições clínicas, sugerindo a presença de doença arterial coronariana. Além disso, oclusão coronária, infarto do miocárdio e microtrombos múltiplos do miocárdio sem alterações nas principais artérias coronárias foram descritos (Michiels *et al.*, 1985; Vianello *et al.*, 2015).

Na presença de sintomas, as queixas mais frequentes são distúrbios microcirculatórios (Griesshammer, 2007). A esplenomegalia ocorre em 25 a 48% dos pacientes e 40% apresentam sintomas vasomotores, caracterizados por cefaléia, síncope, dor torácica atípica, distúrbios visuais, livedo reticular, doenças vasculares e parestesia (Chauffaille, 2010), provavelmente decorrentes do aumento do número de plaquetas e de interações entre pequenos vasos e plaquetas endoteliais anormais (Michiels *et al.*, 1985).

O curso clínico da doença é complicado por episódios trombóticos e hemorrágicos, que ocorrem mais frequentemente em pacientes idosos e naqueles com histórico de eventos vasculares prévios (Finazzi e Harrison, 2005; Vianello *et al.*, 2015). A maioria dos eventos trombóticos se apresenta na forma de trombose venosa profunda e embolia pulmonar (Chauffaille, 2010), enquanto os hemorrágicos, presentes em cerca de 26% dos pacientes, são limitados às manifestações recorrentes de pele, tais como manchas negras, equimoses, hematomas subcutâneos, e sangramentos nasal ou gengival (Brière, 2007).

A maior causa de mortalidade relacionada à doença é a trombose nas grandes artérias, que pode causar danos neurológicos e cardíacos graves e perda das habilidades motoras (Brière, 2007).

2.3.3 Critérios diagnósticos

O diagnóstico correto de TE é fundamental para o prognóstico e tratamento dos pacientes (Barbui *et al.*, 2011). Os critérios diagnósticos da OMS (2008) são essencialmente baseados na contagem de plaquetas, nas características histopatológicas (celularidade da medula normal para a idade, com megacariócitos grandes ou gigantes

dispersos) e na demonstração de clonalidade (Tefferi *et al.*, 2007; Tefferi e Vardiman, 2008). É necessário o preenchimento de todos os quatro critérios diagnósticos da classificação da OMS para o diagnóstico de TE (**Tabela 4**).

A trombocitose como critério diagnóstico foi reduzida de 600 x 10^9/ L para 450 x 10^9/ L, embora esse valor não seja específico da TE. É necessário, portanto, a exclusão de processos transitórios que podem levar à trombocitose reacional, tais como hemorragia aguda, deficiência de ferro, trauma, infecção e doença inflamatória crônica (Tefferi *et al.*, 2007; Tefferi e Vardiman, 2008a; Chauffaille, 2010). Os critérios histopatológicos auxiliam da distinção entre TE e MF pré-fibrótica, que também apresenta trombocitose (Passamonti *et al.*, 2012).

A presença da mutação *JAK2V617F* ou de outro marcador clonal confirma a trombocitose de origem clonal, porém ainda é necessário avaliar a extensão de sangue periférico, que não deve apresentar leucoeritroblastose, e a biópsia de medula óssea, que deve apresentar proliferação megacariocítica sem desvio à esquerda, além da citogenética, para a confirmação do diagnóstico. A ausência da mutação *JAK2V617F* não descarta a possibilidade de TE, visto que cerca de 50% dos pacientes não apresentam essa mutação, e apenas 4% dos pacientes sem a mutação *JAK2V617F* apresentam mutação no gene *MPL* (Pardanani *et al.*, 2006; Tefferi, Skoda e Vardiman, 2009).

Tabela 4 - Critérios diagnósticos para trombocitemia essencial de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008)

	Trombocitemia essencial
1	Contagem de plaquetas mantida acima de 450 × 10^9/L[a]
2	Biópsia de medula óssea mostrando proliferação da linhagem megacariocítica com aumento do número e tamanho de megacariócitos maduros; Pouca ou nenhuma proliferação das linhagens granulocítica ou eritroide.
3	Não atender aos critérios da OMS para PV[b], MFP[c], LMC[d], SMD[e] ou outra neoplasia mieloide
4	Demonstração de *JAK2V617F* ou outro marcador clonal. Na ausência de um marcador clonal, não apresentar evidência de trombocitose reativa.

O diagnóstico da TE requer a presença de todos os quatro critérios. [a] Durante o período de diagnóstico; [b] Requer falha na terapia de reposição de ferro para aumentar a concentração de hemoglobina até a faixa da PV na presença de ferritina sérica baixa. Exclusão de PV é baseada na concentração de hemoglobina e no hematócrito; [c] Requer ausência de fibrose reticulínica ou colagênica relevantes, leucoeritroblastose no sangue periférico, ou medula óssea hipercelular para a idade acompanhada por morfologia de megacariócitos típica para MFP – pequenos a grandes com razão núcleo/citoplasma aberrante e núcleo hipercromático, bulboso ou irregularmente dobrado com agrupamento denso; [d] Requer ausência de *BCR-ABL;* [e] Requer ausência de diseritropoese e disgranulopoese. PV: policitemia vera; MFP: mielofibrose primária; LMC: leucemia mieloide crônica; SMD: síndrome mielodisplásica. Adaptado de Tefferi e Vardiman, 2008.

2.3.4 Fisiopatologia

A hiperplasia de megacariócitos na TE é responsável pelo aumento do número de plaquetas, que leva à redução proteolítica dos múltimeros do fator de von Willebrand, ocasionando uma síndrome de Von Willebrand adquirida. Essa síndrome é reforçada pela ativação das plaquetas com alteração no metabolismo do ácido araquidônico e redução dos receptores de prostaglandina D2, o que mantém o tromboxane2 ativo, facilitando a ocorrência de hemorragias (Bittencourt *et al.*, 2010).

As complicações trombóticas têm sido identificadas como consequência do estado de hipercoabilidade provocado pelo dano endotelial crônico, ativação plaquetária, hiperviscosidade sanguínea e hipoxemia (Vianello *et al.*, 2015).

Os pacientes com TE apresentam TPO sérica normal ou discretamente aumentada, e a relação entre TPO e trombocitose não está bem definida. Progenitores de megacariócitos podem ser hipersensíveis à TPO, apesar de relatos indicarem o crescimento autônomo de culturas de megacariócitos de pacientes com TE (Chauffaille, 2010).

Embora reconhecida como uma doença de origem clonal desde sua caracterização, pouco era conhecido a respeito da patogênese dessa doença até 2005, quando a mutação *JAK2V617F* foi descrita. Aproximadamente 50% dos pacientes com TE apresentam essa mutação, e geralmente com menor carga alélica do que os pacientes com PV e MFP (Moliterno *et al.*, 2006; Passamonti *et al.*, 2006; Antonioli *et al.*, 2008).

Outras mutações além da *JAK2V617F*, tais como as mutações *W515K/L* e *S505N* no gene *MPL*, foram associadas a alterações nas vias de sinalização de moléculas STAT3 e 5, MAPK e PI3K/AKT, responsáveis pelo ganho de função e vantagem proliferativa dos megacariócitos (Cazzola, 2008; Levine e Heaney, 2008).

Mutações no gene supressor tumoral *TET2* foram relacionadas à TE em evolução para MF ou LMA (Saint-Martin *et al.*, 2009; Tefferi, 2010). Essas mutações são encontradas em pacientes com NMPs *JAK2V617F* positivos (17%) e negativos (7%), estando presentes em 16% dos pacientes com PV, 5% dos pacientes com TE, 17% dos pacientes com MFP, 14% dos MFPPV, 14% dos MFPTE e 17% na fase blástica das NMPs (Tefferi *et al.*, 2009; Tefferi, 2010).

Alterações cariotípicas ocorrem em menos de 5% dos casos de TE, sendo, portanto, a NMP com menor frequência de anormalidades citogenéticas. Não há uma

alteração cromossômica específica da TE, porém as mais frequentemente encontradas são as trissomias dos cromossomos 8 e 9 e deleções 13q e 20q (Bacher *et al.*, 2009; Chauffaille, 2010).

2.3.5 Tratamento

O tratamento dos pacientes com TE visa reduzir a ocorrência de eventos trombóticos. Assim sendo, fatores de risco cardiovascular, tais como hipertensão, diabetes, tabagismo, obesidade e hipercolesterolemia devem ser identificados e tratados apropriadamente (Alvarez-Larrán *et al.*, 2010).

Terapias antiplaquetárias reduzem a incidência de trombose venosa em pacientes com TE portadores da mutação *JAK2V617F* e a taxa de trombose arterial nos pacientes com fatores de risco cardiovasculares, embora não sejam efetivas para pacientes de baixo risco (Alvarez-Larrán, 2010). No entanto, a menos que contraindicado, baixas doses de aspirina geralmente são recomendadas para todos os pacientes (Alvarez-Larrán *et al.*, 2010; Beer *et al.*, 2011).

Para pacientes de alto risco, com fatores de risco trombótico estabelecido (idade acima de 60 anos e histórico de trombose prévia), geralmente é recomendada terapia citorredutora, como hidroxicarbamida, anagrelide e IFN-α, embora estudos sobre possível aumento de risco para transformação leucêmica devido ao uso de hidroxicarbamida tenham apresentado resultados controversos (Cortelazzo *et al.*, 1995; Beer *et al.*, 2011).

Assim como na MF, inibidores de JAK têm sido avaliados para uso em pacientes com TE refratários ou tolerantes à hidroxicarbamida. Aparentemente, esses agentes são responsáveis pela redução dos sintomas da doença, inclusive da esplenomegalia (Barbui, Finazzi e Finazzi, 2012; Geyer e Mesa, 2014).

2.4 Angiogênese

O processo complexamente regulado de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes é denominado angiogênese. A vasculatura adulta

permanece quase sempre quiescente, embora mantenha a habilidade de iniciar a angiogênese, que, fisiologicamente, é um processo autolimitado fundamental para a embriogênese, a ovulação e a cicatrização (Schäfer e Werner, 2008). Nessas situações há um balanço adequado entre as citocinas pró e anti-antiogênicas, de maneira que desequilíbrios nesse processo contribuem para condições patológicas, tais como crescimento de tumor, retinopatias proliferativas e degeneração muscular relacionada à idade (Carmeliet, 2005).

A dependência da angiogênese para o crescimento tumoral e propagação metastática foi proposta inicialmente por Judah Folkman, em 1971, visto que os novos vasos fornecem nutrientes e oxigênio e garantem a drenagem eficiente de metabólitos para as células tumorais (Folkman, 1990; Kaafarani *et al.*, 2009). Foi posteriormente demonstrado que a angiogênese possui importante papel em várias doenças hematológicas, inclusive nas NMPs (Lundberg *et al.*, 2000; Wróbel *et al.*, 2003; Kvasnicka e Thiele, 2004; Panteli *et al.*, 2004; Alonci *et al.*, 2008; Carmeliet e Jain, 2011) e a inibição da angiogênese pode ser uma potente estratégia para o tratamento de câncer (Schäfer e Werner, 2008).

A angiogênese é coordenada por diversos ativadores (fatores angiogênicos) e inibidores (fatores anti-angiogênicos). Os fatores de crescimento que estimulam a angiogênese podem atuar de maneira direta, estimulando diretamente as células endoteliais, ou indireta, regulando positivamente a expressão dos fatores diretos (Arora, Mesa e Tefferi, 2004). Dentre os fatores angiogênicos diretos, os principais são o VEGF (Massagué, Blain e Lo, 2000; Ferrara, 2004) e o FGF2 (Polverini, 1995), que agem sinergicamente para a indução da angiogênese. Os fatores angiogênicos indiretos incluem o TGF-β, TNF-α e o PDGF (Arora, Mesa e Tefferi, 2004) (**Figura 4**).

Embora alguns estudos tenham investigado o controle da angiogênese por esses fatores individualmente, a interação entre eles a nível endotelial é pouco compreendida (Ferrari *et al.*, 2009). Além disso, pouco se conhece sobre a fisiopatologia iniciadora da expressão de VEGFA nos tumores hematolinfóides, embora mecanismos análogos aos observados em tumores sólidos sejam antecipados (Dong e Blobe, 2006; Medinger e Passweg, 2014).

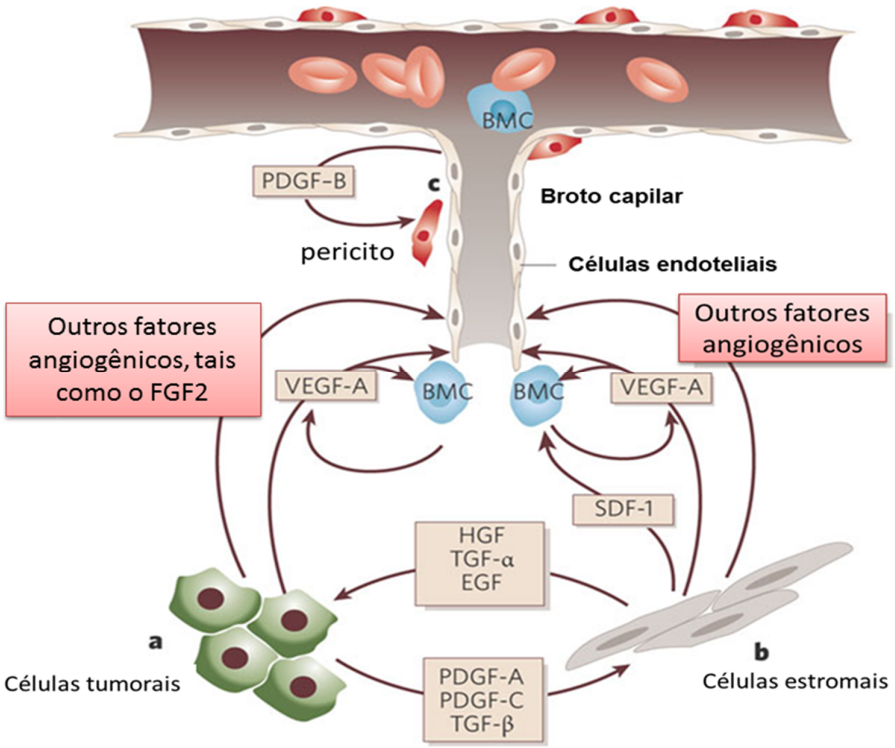

Figura 4 - Alguns dos componentes angiogênicos do tumor/ microambiente microvascular.
a) As células tumorais produzem VEGFA e outros fatores angiogênicos, tais como FGF2, angiopoetina, IL-8, fator de crescimento placentário (PIGF) e VEGF-C, estimulando a proliferação e migração das células endoteliais residentes. b) O estroma é uma fonte adicional de fatores angiogênicos. Esse compartimento é heterogêneo, composto por fibroblastos, células imunes e inflamatórias. Fibroblastos associados a tumores parecem produzir citocinas como fator derivado de células estromais (SDF)-1, que podem recrutar células da medula óssea (BMCs). VEGF-A e PIGF também podem recrutar BMCs. Células tumorais podem liberar fatores de recrutamento celular, tais como PDGF-A, PDGF-C ou TGF-β. Uma função bem estabelecida de fibroblastos associados a tumor é a produção de fator de crescimento/ sobrevivência para células tumorais, tais como ligantes do receptor de fator de crescimento de células endoteliais (EGFR), fator de crescimento de hepatócito (HGF) e heregulina. c) Células epiteliais produzem PDGF-B, que promovem o recrutamento de pericitos na microvasculatura após a ativação do PDGFR-β. BMC: células da medula óssea; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; FGF2: fator básico de crescimento de fibroblastos; VEGF: fator de crescimento de endotélio vascular; SDF: fator derivado de células estromais; TGF: fator de transformação do crescimento; HGF: fator de crescimento de hepatócito; EGF: fator de crescimento epidermal. Adaptado de Ferrara e Kerbel, 2005.

2.4.1 TGFB1

O TGF-β é membro de uma grande família de citocinas pleiotrópicas evolutivamente conservadas. Trinta e três membros estão presentes em mamíferos, incluindo três isoformas de TGF-β (TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3), ativinas e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Heldin, Miyazono e ten Dijke, 1997; Shi e Massagué, 2003).

O TGF-β1 é secretado na forma de proteína latente, e requer ativação para se tornar biologicamente ativo e sinalizar por meio de seus receptores, exercendo a regulação do crescimento de células progenitoras e favorecendo a deposição de matriz extracelular em diversos tecidos, dependendo do tipo celular e do grau de diferenciação das células (Murphy-Ullrich e Poczatek, 2000; Annes, Munger e Rifkin, 2003; de Caestecker, 2004; Campanelli *et al.*, 2011). O TGF-β parece ser o fator de crescimento proveniente de plaquetas mais potente na regulação da atividade de genes envolvidos na síntese da matriz extracelular, e suas funções de estímulo da produção da matriz extracelular e da angiogênese devem ser destacadas (Hasselbalch, 1993).

Os membros da família do TGF-β tem papéis cruciais e específicos durante a embriogênese e na manutenção da homeostase do tecido adulto, enquanto a sinalização do TGF-β controla diversos processos celulares, incluindo proliferação, reconhecimento, diferenciação e apoptose. Devido à sinalização pelo TGF-β geralmente ter efeito negativo no crescimento celular, a inativação dessa via contribui para o desenvolvimento de tumores (Shi e Massagué, 2003). Alterações nas suas vias de sinalização também têm sido relacionadas a distúrbios do desenvolvimento e a doenças, incluindo fibrose, doenças cardiovasculares e autoimunes (Shi e Massagué, 2003; Goumans, Liu e ten Dijke, 2009).

Todos os passos da via de sinalização do TGF-β1 são altamente regulados por fatores especializados, diversos dos quais também são alterados em cânceres humanos (Massagué, Seoane e Wotton, 2005). A sinalização dos ligantes de TGF-β1 ao núcleo é mediada por transdutores de sinais denominados *SMADs* (Heldin, Miyazono e ten Dijke, 1997; Attisano e Wrana, 1998; Wrana, 2000). Existem oito proteínas Smad distintas, constituindo três classes funcionais: os Smads receptores-reguladores (R-Smads), o mediador comum (Co-Smad) e os Inibidores (I-Smads). Estudos que avaliaram expressão dos *SMADs* e sua relação com as NMPs são escassos.

O TGF-β1 regula processos celulares ligando-se a um complexo heteromérico de receptores serina/ treonina (Ser/Thr) quinases tipo I e tipo II na superfície celular (Massagué, 1998). O receptor tipo I, também conhecido como quinases similares a receptores de ativina (ALK), age a jusante do receptor tipo II e propaga o sinal para o núcleo, fosforilando membros específicos da família dos *SMADs* (Derynck, Zhang e Feng, 1998). Os R-*SMADs* (Smad1, 2, 3, 5 e 8) são diretamente fosforilados e ativados por receptores quinases tipo I e submetidos a homotrimerização e formação de complexos heteroméricos com o Co-Smad (Smad4). Os complexos de Smad ativados são translocados no núcleo e, em conjunção com outros cofatores nucleares, regulam a

transcrição de genes alvo, inclusive do próprio TGF-β (Shi e Massagué, 2003; Akhurst, 2012). Os I-Smad (Smad6 e 7) regulam negativamente a sinalização pelo TGF-β, competindo com os R-*SMADs* por interações com o receptor ou com Smad4, e visando os receptores para degradação (**Figura 5**) (Shi e Massagué, 2003; Su, Han e Jiang, 2010).

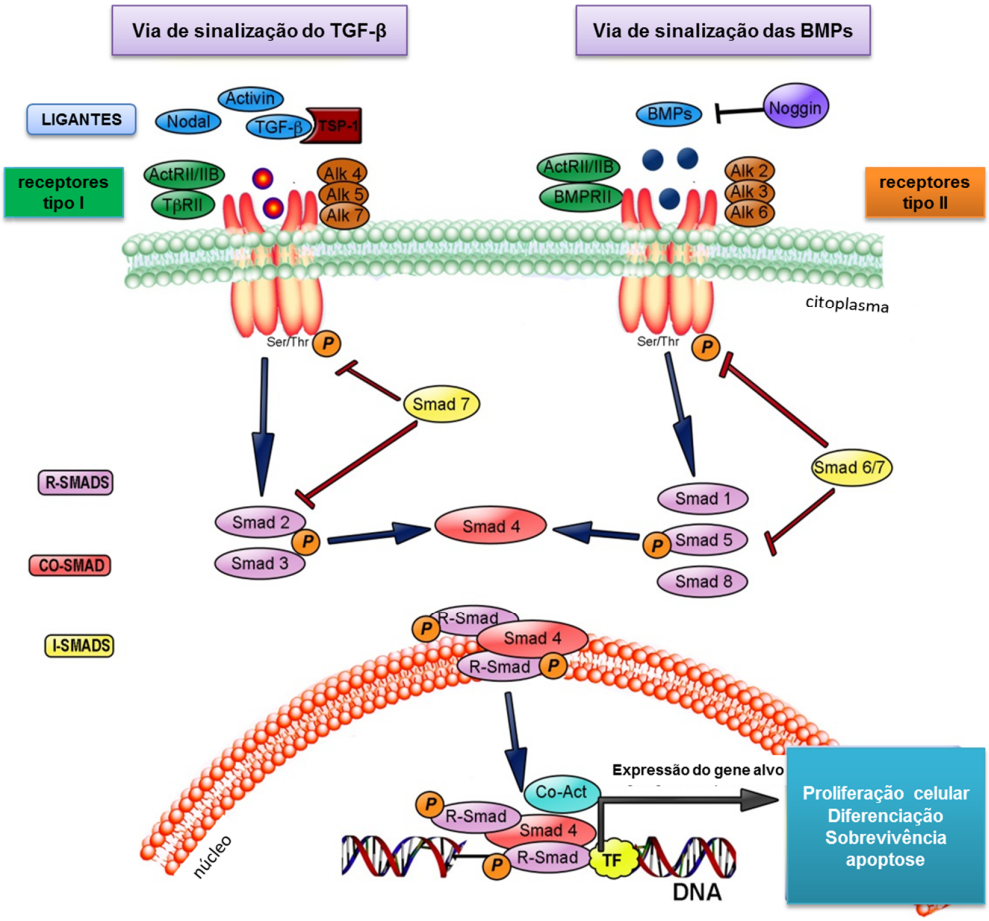

Figura 5 - Transdução de sinal da superfamília do TGF-β.
Ligantes TGF-β, nodais ou activinas se vinculam a receptores tipo II, que se associam a receptores tipo I, levando à transfosforilação desses. Os receptores tipo I ativados fosforilam Smad2/3 (R-*SMADs*), que formam complexo com co-Smad (Smad4) e translocam para o núcleo para se ligarem ao DNA em motivos específicos. As proteínas *SMADs* ativam ou reprimem a transcrição por meio da associação com várias proteínas co-ativadoras (Co-Act) ou co-repressoras. Essa via de sinalização é inibida pelo Smad7. A sinalização via BMPs ocorre de maneira semelhante. BMP6 e BMP7 se ligam ao seu receptor tipo II e esse complexo recruta os receptores tipo I. Alk-3 ou Alk-6, BMP2 e BMP4, no entanto, ligam-se primeiro ao seu receptor tipo I antes de recrutar o receptor tipo II BMPRII. A ligação de BMP ao receptor pode ser inibida pela ligação a vários inibidores de proteína extracelulares, como o noggin. A ativação do complexo receptor leva à fosforilação dos receptores e subsequente fosforilação de Smad1, Smad5, ou Smad8, permitindo que esses formem complexo com Smad4. Esse complexo heterométrico transloca para o núcleo, objetivando genes regulados pelas BMPs, atráves de interações com co-ativadores ou repressores. Smad6 e Smad7 podem agir similarmente para inibir a via BMP por meio de interação com complexos receptores e inibindo a ativação de R-SMADs. As vias de TGF-β e BMP induzem a expressão de proteínas envolvidas na proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose. TGF: fator de transformação do crescimento; BMP: proteína morfogenética óssea; ActRII/ IIB: Receptor de ativina II/ IIB; TβRII: Receptor de fator de transformação do crescimento II; Alk: quinase de linfoma anaplásico; BMPRII: Receptor de proteína morfogenética óssea II; P: fosforilação; R-SMADs: SMADs receptores; Co-Smad: Smad Co-mediador; I-SMADs: SMADs Inibidores; TF: fator de transcrição; Ser/Thr: Serina/ Treonina. Fonte: Adaptado de Villapol, Logan e Symes, 2013.

As BMPs são membros da superfamília do TGF-β e controlam processos celulares tais como proliferação, apoptose, migração e diferenciação em diversos tipos celulares (Chen, Zhao e Mundy, 2004). A via de sinalização BMP-Smad1 apresenta importante papel na resposta ao dano celular e oncogênese, e durante o estresse genotóxico ocorre aumento da ativação e regulação de Smad1 (Chau *et al.*, 2012).

Foi demonstrado que a superexpressão e ativação de Smad1 modifica a resposta biológica de células de linfoma B a membros da família do TGF-β, e há expressão aberrante da via de *SMADs* em outros linfomas não-Hodgkin (Munoz *et al.*, 2004). Dessa maneira, é evidente que a expressão e sinalização dessas proteínas são alteradas em diversos tipos de câncer, porém o impacto funcional dessas alterações ainda não é completamente esclarecido (Chau *et al.*, 2012).

O papel fundamental do TGF-β na indução da angiogênese foi demonstrado em diversos estudos *in vivo* (Roberts *et al.*, 1986; Madri, Pratt e Tucker, 1988; Yang e Moses, 1990; Goumans e Mummery, 2000; Goumans, Liu e ten Dijke, 2009). O TGF-β1 induz a expressão do VEGF nas células endoteliais (Seghezzi *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 2006), sendo particularmente importante nesse processo (Schäfer e Werner, 2008).

Células mononucleares de sangue periférico de pacientes com MF apresentam maior expressão de RNAm e proteína de TGF-β1 (Martyré *et al.*, 1994). As unidades formadoras de colônias de megacariócitos são menos responsivas ao TGF-β1 em pacientes com TE e a expressão reduzida de receptores de TGF-β tipo II (TβRII) em MF e TE, sugere que a perda da sensibilidade ao TGF-β1 pode ser uma característica comum nessas doenças (Dong e Blobe, 2006). Os pacientes com MF, TE e PV também apresentam maiores concentrações plasmáticas de TGF-β total e bioativo do que indivíduos sem a doença, com um balanço TGF-β bioativos/ total alterado, a favor do TGF-β total (Campanelli *et al.*, 2011).

2.4.2 VEGFA

A família do VEGF compreende glicoproteínas diméricas que pertencem à superfamília de fatores de crescimento do PDGF, que são: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD e PIGF. Dentre esses, o VEGFA é o mais estudado, (Joukov *et al.*, 1996; Olofsson *et al.*, 1996; Matsumoto e Claesson-Welsh, 2001) e o mais potente fator angiogênico (Adams e Alitalo, 2007).

O VEGFA é necessário para a quimiotaxia e a diferenciação das células precursoras endoteliais (angioblastos), atua na proliferação das células endoteliais, na vasculogênese e no remodelamento angiogênico (Adams e Alitalo, 2007). Além de controlar diversas funções das células endoteliais envolvidas na angiogênese, o VEGFA protege as células endoteliais dos vasos recém-formados da apoptose pela indução da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Hicklin e Ellis, 2005). *In vitro*, O VEGF é um mitógeno relativamente específico para as células do endotélio vascular que as estimula a degradar a matriz extracelular, migrar e formar tubos. *In vivo*, é responsável por regular a permeabilidade vascular, importante processo para a iniciação da angiogênese (Veikkola *et al.*, 2000).

A sinalização angiogênica para o endotélio vascular é mediada pelo VEGF por meio da alta afinidade com receptores tirosinoquinases. Foram identificados três receptores dos VEGFs, atualmente designados por VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, relativamente específicos para as células endoteliais e com similaridades estruturais e funcionais com o receptor da família PDGF. Em adultos, o VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos principalmente no endotélio vascular, enquanto o VEGFR-3 é restrito em grande parte ao endotélio linfático normal (Veikkola *et al.*, 2000).

A ligação do VEGFA ao receptor VEGFR2 (também conhecido como KDR ou FLK1) promove a diferenciação das células endoteliais, proliferação e brotamento. Em embriões, essa função é contrabalançada pelo VEGFR1 (ou FLT1), que possui alta afinidade com VEGF, mas baixa atividade tirosinoquinase (Adams e Alitalo, 2007).

Pacientes com MF apresentam concentrações plasmáticas e medulares de VEGF elevadas, cujo efeito possivelmente torna as células endoteliais microvasculares hiperpermeáveis, permitindo que liberem proteínas plasmáticas no espaço extravascular, o que leva a intensas alterações na matriz extracelular que podem favorecer a angiogênese e a fibrose (Brogi *et al.*, 1994; Le Bousse-Kerdilès, Martyré e Myelofibrosis, 2001; Wróbel *et al.*, 2003).

Estudos de hibridização *in* situ evidenciaram que o RNAm de VEGF é superexpresso numa ampla maioria de tumores humanos, demonstrando a importância funcional do VEGFA para o desenvolvimento do câncer, e antagonistas do VEGFA foram aprovados para o tratamento de diferentes tipos de tumores (Ferrara e Davis-Smyth, 1997; Ferrara, 2002).

2.4.3 FGF2

Existem 18 fatores de crescimento de fibroblastos em mamíferos (FGF1-FGF10 e FGF16-FGF23) que são agrupados em seis subfamílias, de acordo com as diferenças de homologia de sequência e filogenia (Itoh e Ornitz, 2004). Os FGFs 11 a 14 apresentam alta identidade de sequência com a família FGF, mas não ativam seus receptores e, portanto, geralmente não são considerados membros dessa família (Olsen *et al.*, 2003).

O FGF2 é um fator básico de crescimento de fibroblastos, expresso em diversos tipos celulares, incluindo células estromais hematopoiéticas, tais como megacariócitos e plaquetas (Klagsbrun, 1989). São classicamente considerados fatores parácrinos e conhecidos por seus papéis na modelação tecidual e organogênese durante a embriogênese.

O envolvimento da sinalização FGF em doenças humanas é bem documentado, e a desregulação nessa via pode contribuir para condições patológicas (Beenken e Mohammadi, 2009), tais como câncer, seja conduzindo diretamente a proliferação celular e a sobrevivência das células cancerígenas, ou suportando a angiogênese tumoral (Turner e Grose, 2010).

Nos megacariócitos circulantes e plaquetas de pacientes com MF, por exemplo, o FGF2 é altamente expresso. O aumento local das concentrações de TGF-β e/ou FGF2 e a liberação prolongada de ambos os fatores sequestrados na matriz extracelular e membranas basais podem participar na alteração progressiva do estroma da medula óssea e no processo de angiogênese característico da MF (Le Bousse-Kerdilès e Martyré, 2001).

2.4.4 MiRNAs

Os miRNAs representam uma das classes mais abundantes de moléculas reguladoras de genes em organismos multicelulares. São pequenos RNAs que não codificam proteínas, apresentam 19 a 24 nucleotídeos e regulam a expressão gênica a nível pós-transcricional, inibindo ou reduzindo a expressão do seu gene alvo (Bartel, 2004; Ambros, 2008)

Os mecanismos de regulação ocorrem por supressão da síntese de proteínas pelos ribossomos, ou pela degradação do RNAm (Bartel, 2004; Vasudevan, Tong e Steitz,

2007). Além disso, a deadenilação do RNAm induzida por miRNA promove a repressão da tradução, visto que a remoção da cauda poli A (adenina) do RNAm dificulta o recrutamento desse ao ribossomo (Beilharz *et al.*, 2009; Fabian, Sundermeier e Sonenberg, 2010). Em animais, os miRNAs mais estudados formam híbridos imperfeitos com a região 3' não traduzida do RNAm, sendo que a complementariedade total ocorre ocasionalmente (Bartel, 2009; Fabian, Sonenberg e Filipowicz, 2010).

A biogênese dos miRNAs envolve um complexo sistema de proteínas, incluindo membros da família Argonaut, transcrição dependente de Polimerase II e RNAses III Drosha e Dicer. Os miRNAs primários longos (pri-miRNAs) transcritos são reconhecidos pela Drosha nuclear para serem processados na forma de grampo dos precursores (pré-miRNAs), que são então transportados do núcleo para o citoplasma pela exportina-5 (Exp-5). A Dicer, com suposta atividade helicase, produz a fita simples de miRNA madura, que é então carregada no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde pode diretamente regular os RNAm alvo contendo as sequências antisenso. Normalmente uma fita produzida pela Dicer é mantida, mas não se sabe como a outra metade é degradada. Aqueles miRNAs que formam duplexes perfeitas com seus alvos os degradam diretamente, e os que formam duplexes parciais inibem a expressão da proteína (**Figura 6**) (Bartel, 2004; Pasquinelli, Hunter e Bracht, 2005).

Os miRNAs estão envolvidos em processos biológicos cruciais, incluindo desenvolvimento, diferenciação, apoptose e proliferação, e foi proposta sua contribuição para a oncogênese, por poderem funcionar como supressores tumorais ou oncogenes (Calin e Croce, 2006).

Há crescentes evidências de que a angiogênese seja regulada por mecanismos epigenéticos, particularmente por miRNAs (Buysschaert *et al.*, 2008). Os miR-221 e miR-222, por exemplo, apresentam função anti-angiogênica *in vitro*, e o cluster miR-17-92 promove a angiogênese *in vivo*. Outros estudos *in vitro* sugerem que let-7f e miR-27b são necessários para a ocorrência do processo de angiogênese. De fato, os miRNAs envolvidos na angiogênese estão altamente expressos nas células endoteliais. No entanto, outros miRNAs menos expressos em condições fisiológicas podem estar positivamente regulados em certas condições, e sua expressão baixa ou ausente pode ser importante para a manutenção do estado fisiológico das células endoteliais (Kuehbacher *et al.*, 2007).

De acordo com o banco de dados de miRNAs miRWalk (Dweep *et al.*, 2011) (http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/genetarget.html), o gene *TGFB1* já

foi validado como alvo de diversos miRNAs, e dentre eles, selecionamos para esse estudo os miRNAs miR-193a-5p, miR-369-5p, miR-542-5p, miR-590-5p e miR-590-3p.

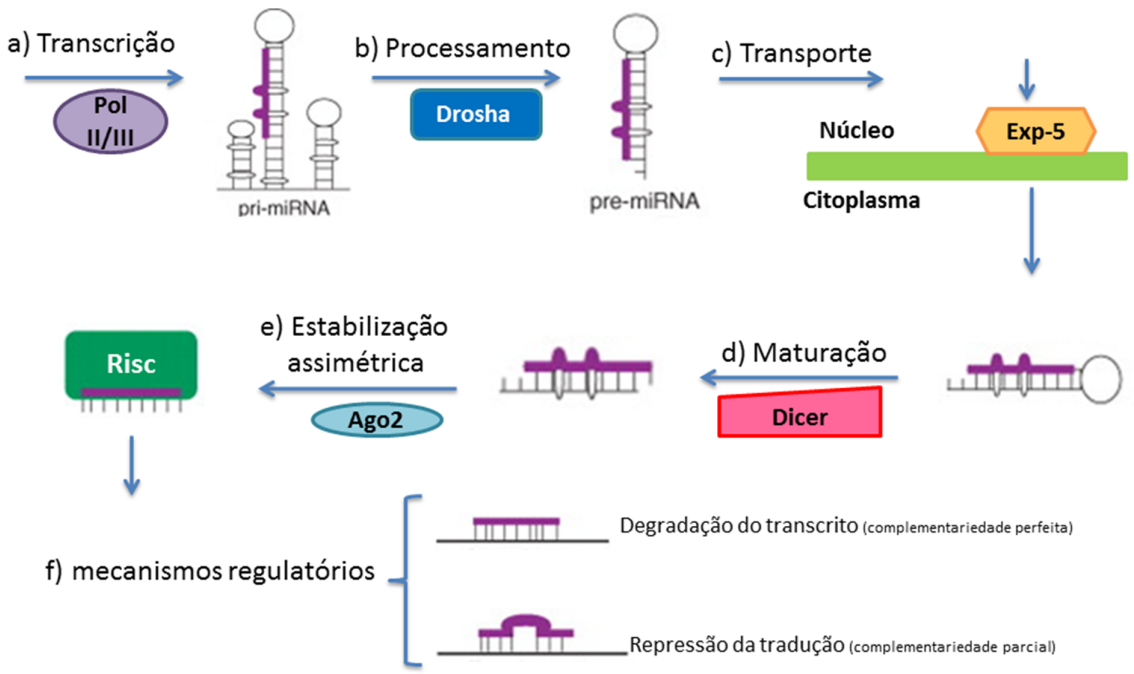

Figura 6 - Biogênese e regulação dos microRNAs.
A maturação canônica dos miRNAs inicia-se pela produção do miRNA transcrito primário (pri-mRNA) pela RNA polimerase II ou III e clivagem do pri-miRNA pela Drosha no núcleo. O precursor (pre-miRNA) *hairpin* é exportado do núcleo pela Exportina-5 (Exp-5), e no citoplasma, a RNAse Dicer cliva o *hairpin* pre-miRNA no seu tamanho maduro. A fita madura de miRNA é carregada juntamente com proteínas Argonaute (Ago)2 no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde guiará o RISC para silenciar RNAm alvos por meio da clivagem do RNAm ou repressão da tradução. Fonte: Adaptado de Pasquinelli, Hunter e Bracht, 2005; Winter *et al.*, 2009.

Como o TGF-β1 possui papel fundamental na indução da angiogênese e os miRNAs possuem a capacidade de regular a expressão do gene alvo, aumentando ou inibindo sua expressão, é importante compreender de que maneira esses miRNAs influenciam a angiogênese. Assim, esse estudo investigou se a expressão de alguns miRNAs que possuem o *TGFB1* como alvo encontravam-se diferencialmente expressos em pacientes com MF e TE.

Esse estudo pretendeu esclarecer o papel do TGF-β1 na angiogênese na MF e TE, avaliando a regulação do gene do TGF-β1 pelas proteínas transdutoras de seu sinal, as *SMADs*, e pela a expressão de miRNAs que possuem esse gene como alvo, identificando seus papéis na angiogênese, além de compreender a interação entre FGF2, TGF-β1 e VEGFA nesse processo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito da expressão de RNAm da família dos *SMADs* (*SMAD*1 a *SMAD7*) e de microRNAs (miR-193a-5p, miR-369-5p, miR-542-5p, miR-590-3p e miR-590-5p) na expressão gênica (RNAm e proteínas plasmáticas) de *TGF-β1* e avaliar seu papel na fisiopatologia da angiogênese em pacientes com MF e TE.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as concentrações plasmáticas de marcadores da angiogênese (TGF-β1, VEGFA e FGF2,) em pacientes MFP, MFPTE e TE e em seus respectivos controles e correlacionar as concentrações plasmáticas de TGF-β1 às de VEGFA e FGF2;
- Quantificar a expressão de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* e de *SMADs* (*SMAD1* a *SMAD7*) em leucócitos totais de sangue periférico de pacientes com MFP, MFPTE e TE e de seus respectivos controles. Correlacionar a expressão de RNAm de *TGFB1* com as expressões de RNAm de *VEGFA* e *FGF2* de *SMADs*, e avaliar se as expressões de RNAm de *VEGFA*, *FGF2* e de *SMADs* estão associadas a variações no log10 de TGF-β1 plasmático;
- Avaliar se existe diferença na expressão gênica de *TGF-β1* em cada grupo de pacientes segundo a intensidade da angiogênese, determinada de acordo com as medianas das concentrações plasmáticas de VEGFA e FGF2 concomitantemente;
- Quantificar a expressão de miR-193a-5p, miR-369-5p, miR-542-5p, miR-590-3p e miR-590-5p, que possuem o gene *TGFB1* como alvo, em leucócitos totais de pacientes com MFP, MFPTE e TE e de seus respectivos controles;
- Avaliar o grau de microvasculatura (angiogênese estimada) por meio da imunoexpressão de CD34 em cortes histológicos de biópsia de medula óssea de pacientes com MFP, MFPTE e TE;

- Determinar as imunoexpressões de TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL nas biópsias de medula óssea de pacientes com MFP, MFPTE e TE; verificar se existe diferença dessas imunoexpressões entre os grupos de pacientes;
- Quantificar a expressão de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* em aspirados de medula, e correlacionar essas expressões com a angiogênese estimada (CD34);
- Determinar a presença de mutações *JAK2V617F*, MPLW515K/L e *CALR* nos pacientes com MFP, MFPTE e TE;
- Avaliar se a carga alélica da mutação *JAK2V617F* está associada às concentrações plasmáticas e expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2*, às expressões de RNAm dos *SMADs*, às expressões dos microRNAs e aos dados hematológicos dos pacientes com MFP, MFPTE e TE positivos para a mutação *JAK2V617F*;
- Investigar se as citocinas angiogênicas (TGF-β1, VEGFA e FGF2) são diferentemente expressas nos pacientes, em relação às proteínas e RNAm, de acordo com a mutação apresentada.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O presente projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em 27 de agosto de 2012, sob o número do parecer 88.940. Em março de 2014, a Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica (PUC) de Sorocaba (Parecer do adendo no CEP 571.670, de 27 de março de 2014) foi incluída nesse estudo. Em 28 de novembro de 2014 o adendo para análise de mutações no gene *CALR* nas amostras já coletadas foi aprovado (Parecer 890.787).

Os pacientes com MF e TE e os controles incluídos no estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Os que foram favoráveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário com as seguintes informações (quando aplicável): data de nascimento, gênero, peso, altura, tempo de diagnóstico da doença, uso de medicação (hidroxicarbamida), presença de sintomas constitucionais (febre, sudorese noturna, perda de peso), presença de diabetes e/ou hipertensão ou de alguma doença inflamatória.

4.2 Casuística

4.2.1 Pacientes

Foram incluídos 78 pacientes com NMPs nesse estudo, embora as amostras de quatro pacientes tenham sido excluídas devido à baixa qualidade do RNA, e outros oito pacientes foram excluídos por terem MFPPV. Assim, do total de 66 pacientes incluídos nas análises desse trabalho, 21 tinham diagnóstico de MFP, 24 de TE e 21 de MFPTE.

Os casos foram selecionados baseados no diagnóstico de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2008 (Spivak e Silver, 2008), por meio da biópsia de medula óssea e mielograma, para os pacientes com MFP ou TE, enquanto o diagnóstico da MF secundária (pós-TE) obedeceu aos critérios do *International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment* (IWG-MRT).

Os pacientes, de ambos os gêneros, com idades compreendidas entre 27 e 93 anos, eram atendidos na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP, sob a supervisão da Dra. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille, ou na Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da PUC de Sorocaba, sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Gil Cliquet.

Os aspirados e biópsias de medula óssea foram coletados em caso de necessidade diagnóstica ou para acompanhamento do tratamento, de acordo com a indicação médica. Dessa modo, foram coletadas as biópsias da medula óssea, de 26 pacientes, sendo 8 com MFP, 8 com MFPTE e 10 com TE. Foram obtidos os aspirados medulares de seis desses pacientes, sendo dois com MFPTE e quatro com TE.

Foram excluídos desse estudo os pacientes portadores de doenças infecciosas, fúngicas, bacterianas ou virais. Tais informações foram obtidas por meio de entrevista e avaliação do prontuário. Não foram incluídas nas análises desse estudo as amostras dos pacientes com RNA de qualidade insatisfatória e dos oito pacientes portadores de MFPPV.

4.2.2 Controles

Foram incluídos 98 indivíduos controles, sendo que 42 desses foram pareados com os pacientes com MFP, 48 com os pacientes com TE e 40 com os pacientes com MFPTE. Dois dos controles foram excluídos, devido a alterações nos hemogramas. O pareamento dos controles foi realizado de acordo com o gênero e a idade dos pacientes.

Os indivíduos desse grupo são funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e da UNIFESP, além de indivíduos de instituições específicas da cidade de São Paulo, tais como a “Casa Cristã do Idoso – Núcleo de Convivência para Idosos” (Bairro Butantã), “Associação Idade Dourada” (Bairro Pinheiros), e “Paróquia São Mateus” (Bairro Rio Pequeno).

Além dos exames previstos nesse projeto, foram analisados o hemograma e a determinação de proteína C reativa ultrassensível (PCRus) de cada indivíduo para

confirmar seu bom estado hematológico e bioquímico. Foram excluídos indivíduos que declararam ter apresentado febre, infecções, inflamações e alergias no último mês, condições essas que podem alterar o perfil das citocinas, e indivíduos que faziam uso de medicação, exceto para o tratamento de hipertensão arterial e/ou diabetes.

4.3 Amostras biológicas

Foram coletados 7,5 mL de sangue periférico em tubos Paxgene™ (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikonm, CH) para a extração de RNA, 8 mL em tubo a vácuo contendo EDTA (sistema Vacutainer®) para obtenção de DNA e plasma, e 6 mL de sangue periférico em tubos sem anticoagulante (sistema Vacutainer®) para obtenção de soro, dos pacientes e controles, após jejum pelo período de oito horas.

As amostras de medula óssea para o presente estudo foram obtidas juntamente com a coleta para os exames de diagnóstico ou acompanhamento do tratamento. Do volume de medula colhido, cerca de 2 a 3 mL foram empregados nesse projeto de pesquisa. A medula óssea foi coletada em seringa heparinizada e transferida para tubos PAXgene® específicos para medula óssea para posterior extração de RNA. A biópsia da medula óssea e a história clínica de cada um dos pacientes foram adquiridas pelo médico assistente.

4.4 Métodos

Análises realizadas nas amostras todos os participantes do estudo (pacientes com MFP, MFPTE e TE e indivíduos controles)

4.4.1 Determinação do hemograma e de PCRus

Os dados hematológicos foram obtidos pelo contador eletrônico Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, Santa Clara/CA, EUA), enquanto as determinações de PCRus foram realizadas por imunoturbidimetria ultrassensível.

4.4.2 Dosagem das concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2

As concentrações de TGF-β1 (#TGFB-64K-01), VEGFA e FGF2/ bFGF (#HAGPIMAG-12K-02) foram determinadas em duplicata empregando-se o kit Luminex x-MAP (Luminex®, Austin/TX, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. No entanto, as amostras não foram diluídas devido às concentrações esperadas dos analitos. Foram usadas amostras de plasma estocadas a -80°C até o momento da análise.

4.4.3 Extração e avaliação da qualidade de RNA de sangue periférico e de medula óssea

O RNA total do sangue periférico foi obtido empregando-se PAXGENE Blood miRNA kit e PAXGENE Blood RNA kit (PreAnalytix/ Qiagen, Alemanha), enquanto o RNA da medula óssea foi extraído empregando-se o kit PAXGENE Bone Marrow RNA kit (PreAnalytix/ Qiagen, Alemanha), conforme protocolos do fabricante.

A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese capilar usando-se *Agilent RNA Kit* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA) e o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA), ou por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed™ (Biotium, Hayward/CA, EUA).

Para as amostras analisadas por *Bioanalyzer*, foram consideradas íntegras aquelas com número de integridade de RNA (*RNA Integrity Number* - RIN) maior que sete. Para a avaliação em gel de agarose, foram consideradas íntegras as amostras com as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S visíveis no gel de agarose, sob luz UV em equipamento MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria, e a pureza foi determinada pela relação A_{260nm}/ A_{280nm} empregando-se o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). O RNA foi aceito como puro quando a relação 260/280 foi de aproximadamente 2,0. Em seguida, as amostras de RNA total foram armazenadas a -80°C até o momento da síntese do DNA complementar (cDNA).

4.4.4 Síntese de DNA complementar (cDNA) para as análises de RNAm

Para a síntese de cDNA, as amostras de RNA provenientes de sangue periférico e medula óssea foram novamente quantificadas por espectofotometria. A síntese do cDNA de RNAm foi realizada por reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O ensaio foi realizado empregando-se o kit *SuperScriptVilo™ Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA), com concentração final de RNA total de 500 ng, seguindo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas em termociclador *Mastercycler Gradient* modelo 22331 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), com as seguintes etapas: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C.

4.4.5 Escolha do gene de referência para as análises de RNAm

A análise da expressão de RNAm foi feita pelo método de quantificação relativa usando genes de referência como controles endógenos. Seis genes foram selecionados para serem testados como referência, com o objetivo de avaliar quais deles apresentavam-se mais estáveis na casuística desse estudo. Foi realizada PCR em tempo real, usando amostras de pacientes com MF e TE e de controles para cada um dos seis genes escolhidos.

Para as reações de amplificação foram empregados 3,5 µL de água Milli-Q® autoclavada e tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), 5,0 µL de *Taqman® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA), 0,5 µL do ensaio e 1,0 µL de cDNA em cada reação. As condições de termociclagem foram: 50 ºC por 2 minutos, 95 ºC por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 ºC por 15 segundos e 60 ºC por 1 minuto. As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) usando-se ensaios *Taqman® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) descritos na **Tabela 5**. A amplificação foi avaliada por monitoração contínua de fluorescência, conforme previamente descrito (Hirayama *et al.*, 2008).

Tabela 5 - Características dos ensaios *Taqman*® empregados para avaliação da expressão dos genes de referência candidatos pela técnica de PCR em tempo real

Gene	Identidade do ensaio	Fragmento amplificado (pb)
ACTB	Hs01060665_g1	63
B2M	Hs00984230_m1	81
GAPDH	Hs00266705_g1	74
HMBS	Hs00609293_g1	62
HPRT1	Hs02800695_m1	82
UBC	Hs02800695_m1	135

ACTB: beta-actina; *B2M*: beta-2-microglobulina; *GAPDH*: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; *HMBS*: hidroximetil butirato sintase; *HPRT1*: hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *UBC*: ubiquitina C; pb, pares de bases.

Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram analisados controles sem amostra (controle negativo) com a finalidade de avaliar possíveis contaminações dos reagentes com os produtos de PCR.

Para a escolha desses genes usou-se o programa qbasePLUS, versão 2.4 (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica), baseado no geNorm™ (Vandesompele *et al.*, 2002). A expressão relativa de cada um dos genes foi calculada, e os dados foram inseridos no programa G*eNorm*^{TM} (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/), que gera uma planilha mostrando os genes mais e menos estáveis. De acordo com o programa, o gene considerado com menor estabilidade de expressão (M) para as amostras foi o *HMBS* (M=1,707), com estabilidade intermediária foram os genes *UBC* (M=1,084), *BM2* (M=0,812) e *HPRT1* (M=0,684) e os genes com maior estabilidade foram *GAPDH* (M=0,668) e *ACTB* (M=0,624) (**Figura 7**). Tais coeficientes foram considerados adequados para a condução dos experimentos, pois estão dentro do valor de estabilidade de expressão aceitável para matrizes complexas (M≤1), tais como o sangue (Hellemans *et al.*, 2007). Desse modo, os genes *ACTB* e *GAPDH* foram selecionados para serem usados como referência.

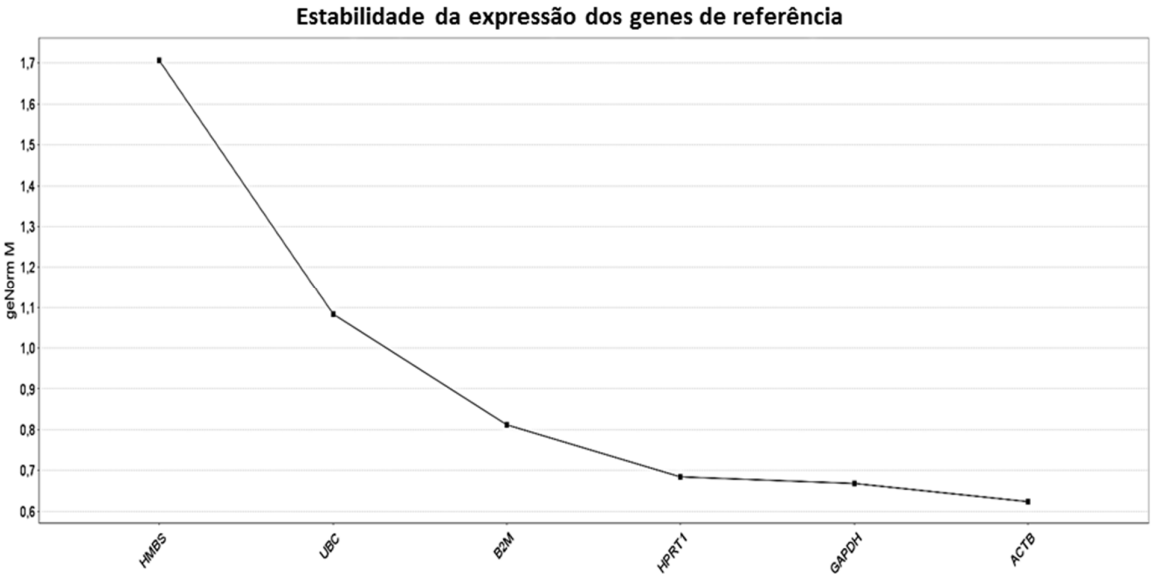

Figura 7 - Posição dos genes de referência candidatos, como determinado pelo software GeNorm.
Os genes foram ordenados de acordo com a estabilidade de expressão entre as amostras. Da esquerda para a direita estão indicados os genes em ordem crescente de estabilidade. *ACTB,* beta-actina; *B2M*, beta-2-microglobulina; *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; *HMBS*, hidroximetilbilano sintase; *HPRT1*, hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *UBC*, ubiquitina C.

4.4.6 Quantificação da expressão de RNAm (*TGFB1*, *VEGFA*, *FGF2* e *SMAD1* a *SMAD7*) por PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real para determinar a expressão de RNAm foram realizados em duplicata, empregando-se *Taqman® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), com o equipamento *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os ensaios empregados estão descritos na **Tabela 6**. O mesmo controle de qualidade da seleção de RNAm de referência foi usado. As análises foram realizadas em RNA proveniente de leucócitos totais de sangue periférico e da medula óssea.

Os resultados foram analisados com o software *System* 7500 versão 2.0.6 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. Para a quantificação relativa da expressão de RNAm, foi usado o método comparativo com ciclo de *threshold* (C_T) (Livak e Schmittgen, 2001). A fórmula empregada foi $2^{-\Delta C_T}$, onde ΔC_T é igual ao C_T do gene de interesse menos o C_T do gene de referência.

Resultados para *SMAD8/9* não foram apresentados, pois, após inúmeras tentativas, não foi possível obter a expressão de RNAm desse gene nos leucócitos totais

dos pacientes. Os valores de C_Ts apresentaram-se acima de 36 ou indeterminados, ou seja, a amplificação iniciou-se após 35-36 ciclos da PCR em tempo real, indicando baixa especificidade da reação, diminuindo a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 6 - Características dos ensaios *Taqman*® empregados para avaliação da expressão dos genes *TGFB1*, *VEGFA*, *FGF2* e *SMAD1* a *SMAD8/9*

Gene	Identidade do ensaio	Fragmento amplificado (pb)
TGFB1	Hs00998133_m1	57
VEGFA	Hs00900055_m1	59
FGF2	Hs00266645_m1	82
SMAD1	Hs00195432_m1	67
SMAD2	Hs00183425_m1	129
SMAD3	Hs00969210_m1	87
SMAD4	Hs00929647_m1	86
SMAD5	Hs00195437_m1	96
SMAD6	Hs00178579_m1	91
SMAD7	Hs00998193_m1	105

pb: pares de bases

4.4.7 Síntese de cDNA para as análises de miRNAs

A síntese de cDNA para as análises das expressões de miRNAs foi realizada com RNA proveniente de leucócitos totais de sangue periférico. Algumas amostras desse estudo apresentavam alta concentração de RNA, porém muitas não dispunham de concentração suficiente para a síntese de cDNA a 50 ng/µL. Assim, foi padronizada a concentração de 35 ng/µL, visando incluir a maioria das amostras, embora muitas delas ainda apresentassem a concentração necessária, mas não a quantidade de RNA suficiente para a síntese de cDNA. Algumas amostras de RNA foram reextraídas, mas não havia material disponível de todos os pacientes. Como já havíamos recoletado amostras de diversos pacientes e alguns controles, seria inviável voltarmos a coletar novamente desses indivíduos. Além disso, não havia tempo hábil para a recoleta e reextração das amostras, devido ao prazo estipulado pela FAPESP, financiadora desse projeto, para a conclusão do trabalho e envio de relatório.

Para os ensaios *Taqman*® de miRNAs é necessário fazer a transcrição reversa usando-se um prímer em alça (*stem loop*) específico para cada miRNA. Para tanto, foi

realizada a transcrição reversa empregando-se o *Taqman® microRNA RT Kit*, que contém a transcriptase Multiscribe, e prímers fornecidos pelo *Megaplex Primer Pools* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Cada reação foi realizada com 35 ng/µL de RNA total, 3,77 µL de água DEPC, 1,0 µL do tampão, 0,126 µL de inibidor de RNAse, 0,1 µL de dNTP, 0,66 µL da transcriptase e 1,0 µL de prímer. A ciclagem usada foi: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C, em termociclador *Mastercycler Gradient* modelo 22331 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até posterior análise.

4.4.8 Seleção de pequenos RNAs nucleolares (SnoRNAs) de referência para análise dos miRNAs

As análises das expressões de miRNAs foram realizadas pelo método de quantificação relativa, usando SnoRNAs de referência como controles endógenos. Foi realizada PCR em tempo real usando amostras de pacientes com MF e TE e de controles para cada um dos seis SnoRNA escolhidos.

Inicialmente, foi feito um teste empregando um *pool* de primers endógenos para a síntese de cDNA. Os SnoRNAs testados foram: RNU6B, RNU24, RNU48, RNU49, RNU44 e RNU66. Foram adicionados 1,0 µL de cada prímer RT (5X) e 94,0 µL de água DEPC em um tubo. Em seguida, a transcrição reversa foi feita empregando-se esse *pool* de prímers, com seis amostras (duas de cada grupo estudado: MF, TE e controles, na concentração de 100 ng/µL), e o *Taqman® microRNA RT Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Conforme o protocolo, foram empregados 6,0 µL de *pool* de prímers, 0,30 µL de dNTP mix, 3,0 µL de multiscribe transcriptase, 1,5 µL de tampão, 0,19 µL de inibidor de RNAse, e 1,01 µL de água DEPC – para cada amostra, além de 3,0 µL de RNA total a 100 ng/ µL. Após 5 minutos em gelo, as amostras foram levadas ao termociclador *Mastercycler Gradient* modelo 22331 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), por 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C, e 4°C infinito.

Para as reações de amplificação foram usados 4,42 µL de água DEPC, 5,0 µL de *Taqman® Universal Master Mix II, no AmpErase UNG* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA), 0,5 µL do ensaio e 0,08 µL de cDNA em cada reação. As condições de termociclagem empregadas foram: 50ºC por 2 minutos, 95ºC por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 ºC por 15 segundos e 60 ºC por 1 minuto. O mesmo controle de

qualidade para seleção dos genes de referência foi empregado. As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) usando-se os ensaios *Taqman® miRNA Assays* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) descritos na **Tabela 7.** A amplificação foi avaliada por monitoração contínua de fluorescência, conforme previamente descrito (Hirayama *et al.*, 2008).

Tabela 7 - Características dos ensaios *Taqman®* empregados para avaliação da expressão dos SnoRNAs de referência candidatos pela técnica de PCR em tempo real

SnoRNAs	Identidade do ensaio	Acesso NCBI
RNU6B	001093	NR_002752
RNU24	01001	NR_002447
RNU44	001094	NR_002750
RNU48	001006	NR_002745
RNU49	001005	NR_002744
RNU66	001002	NR_002444

Para a escolha dos SnoRNAs de referência usou-se o programa Normfinder, versão 2.4 (Moma Aarhus University Hospital, Denmark) (Andersen, Jensen e Ørntoft, 2004). A expressão relativa de cada um dos genes foi calculada, e os dados foram inseridos no programa Normfinder^{TM} (http://moma.dk/normfinder-software), que gera uma planilha mostrando os SnoRNAs mais e menos instáveis. De acordo com o programa, o SnoRNA considerado com menor estabilidade de expressão (M) para as amostras foi o RNU6B (M=0,262), com estabilidade intermediária foram RNU44 (M=0,040), RNU48 (0,039), RNU66 (M=0,038), e os SnoRNAs com maior estabilidade foram RNU49 (M=0,015) e RNU24 (M=0,013). Desse modo, selecionamos os SnoRNAs RNU24 e RNU49 para serem empregados como referência.

4.4.9 Quantificação das expressões de miRNAs (miR-193a-5p, miR-369-5p, miR-542-5p, miR-590-5p e miR-590-3p) por PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real para miRNAs foram realizados em duplicata, empregando-se Taqman® *miRNA Assay* (Applied Biosystems, USA), com o equipamento *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os ensaios usados estão descritos na **Tabela 8**. O mesmo controle de qualidade da seleção de RNAm de referência foi empregado e a análise dos resultados da expressão de miRNAs foi realizada da mesma forma adotada para a expressão de RNAm.

Tabela 8 - Características dos ensaios Taqman® empregados para avaliação das expressões de miR-193a-5p, miR-369-5p, miR-542-5p, miR-590-5p e miR-590-3p pela técnica de PCR em tempo real

microRNA	Identidade do ensaio	Sequência do miRNA maduro
miR-193a-5p	002281	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA
miR-369-5p	001021	AGAUCGACCGUGUUAUAUUCGC
miR-542-5p	002240	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA
miR-590-5p	001984	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGCAG
miR-590-3p	002677	UAAUUUUAUGUAUAAGCUAGU

Análises realizadas apenas nos pacientes

4.4.10 Determinações do mielograma e/ou da biópsia da medula óssea

O mielograma e a biópsia de medula óssea foram obtidos pelo médico responsável pelo paciente na UNIFESP ou na PUC. Esses são exames assistenciais das unidades colaboradoras desse trabalho, tendo sido realizados na UNIFESP, sob os cuidados da Dra. Maria Regina Régis Silva.

Os tecidos de biópsia da medula óssea foram fixados em formalina tamponada 10%, processados de acordo com técnicas de histologia convencionais e embebidos em parafina. Os cortes foram submetidos aos seguintes protocolos de coloração: Hematoxilina-eosina, Giemsa e impregnação com a prata de Gomori (reticulina). As

lâminas histológicas foram analisadas independentemente por dois patologistas, e casos discordantes foram revistos em conjunto.

4.4.11 Análise citogenética para pesquisa de alterações cromossomais

Essas análises são realizadas como rotina na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP, sob supervisão da Dra. Maria de Lourdes Chauffaille. Parte da medula colhida foi colocada em tubo heparinizado e a análise citogenética de banda G foi realizada conforme método anteriormente descrito (Mitelman, Mertens e Johansson, 1997). Para cada amostra, 20 metáfases foram estudadas de acordo com as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN, 2009).

4.4.12 Análises imunoistoquímicas

Essas análises foram realizadas pela Dra. Maria Regina Régis Silva e pelo Dr. César Cilento Ponce nas biópsias de medula óssea de 26 pacientes. Todas as lâminas foram avaliadas independentemente pelos dois pesquisadores, e casos discordantes foram revistos em conjunto.

4.4.12.1 Preparo das amostras

Para todas as análises imunoistoquímicas realizadas, as biópsias de medula foram cortadas com dois micrômetros, recolhidas em lâmina polarizada. Os cortes foram processados usando-se xileno e álcool quentes (por 20 minutos) e frios (por 20 minutos) para desparafinização. Foram realizados cinco bloqueios de atividade da peroxidase endógena.

4.4.12.2 Angiogênese estimada – grau de microvasculatura

A quantificação da densidade microvascular foi realizada com o uso de IgG (imunoglobulina)1 kappa monoclonal de camundongo anti-CD34 Classe II humano (Dako-M7165 - QBEnd 10) em seções de medula óssea, conforme previamente descrito (Ponce *et al.*, 2012; Ponce *et al.*, 2014), com diluição de 1:100.

A angiogênese foi avaliada em cada amostra usando graduação visual da microvasculatura. As lâminas foram visualizadas e escaneadas em aumento de 100x, 200x, e 400x e graduadas semiquantitativamente pela coloração com CD34, usando-se microscópio de luz. A escala semiquantitativa empregada foi: microvasos grau 1 (vasos escassos), grau 2 (ligeiro aumento difuso nos vasos), grau 3 (áreas com aumento acentuado no número de vasos), e grau 4 (aumento extensivo do número de vasos). As contagens atribuídas para os resultados de imunoexpressão avaliados foram comparados entre os grupos de pacientes.

4.4.12.3 Imunoexpressões de TGF-b1 ativo e TGF-β1 latente

A análise das imunoexpressões de TGF-b1 ativo e TGF-β1 latente foram realizadas conforme método previamente descrito (Ponce *et al.*, 2012; Ponce *et al.*, 2014). Foram empregadas IgG policlonal de coelho anti-TGF-b1 ativo humano (Santa Cruz Biotech; SC-146) e IgG policlonal de cabra anti-peptídeo associado à latência (LAP) humana para TGF-β1 latente (R&D Systems; AF-246-NA).

As amostras foram incubadas em diluição de 1:100 do anticorpo primário (para TGF-b1 ativo) ou 1:25 (para TGF-β1 latente) por 18 horas a 4ºC. A biotina foi usada como anticorpo secundário por 40 minutos, e em seguida foi realizado tratamento com estreptavidina-peroxidase. A visualização foi feita com cromógeno diaminobenzidina e contracorado usando hematoxilina de Harris.

As concentrações de anti-TGF-b1 (ou TGF-b1 ativo) e Anti-LAP humano TGF-β1 (ou TGF-β1 latente) foram avaliadas por observação em microscópio de luz de 100 megacariócitos consecutivos por caso para determinar a positividade e intensidade. A positividade foi avaliada usando intensidades de 0-3 baseados na porcentagem de células positivas. A intensidade de imunoexpressão foi designada como negativa, fraca, moderada ou forte, numa escala de 0 a 3.A contagem final de imunocoloração paraTGF-

b1 ativo e TGF-β1 latente foi obtida pela multiplicação das duas variáveis analisadas (positividade e intensidade), variando entre 0 e 9 (**Tabela 9**). As contagens atribuídas para as imunoexpressões dos antígenos investigados foram comparadas entre os grupos de pacientes.

4.4.12.4 Análise da imunoexpressão de c-MPL

A análise da imunoexpressão de c-MPL nas biópsias foi realizada conforme método descrito por Ponce e colaboradores (2012). Foram usados anticorpos policlonais IgG c-MPL de coelho (anti-TPO-R humano) (Life Span Biosciences/LS-C26341).

As amostras foram incubadas numa diluição de 1:50 do anticorpo por 18 horas a 4ºC. A biotina foi empregada como anticorpo secundário por 40 minutos, e em seguida foi realizado o método de estreptavidina-peroxidase. A visualização foi feita com cromógeno diaminobenzidina e contracorado usando hematoxilina de Harris.

A expressão de c-MPL foi avaliada por observação em microscópio de luz de 100 megacariócitos consecutivos por caso para determinar a positividade e intensidade. A positividade e a intensidade da imunoexpressão e a contagem final de imunocoloração para c-Mpl foi obtida da mesma maneira do que para o TGF-β1, de acordo com a **Tabela 9**.

Tabela 9 - Avaliação da imunoexpressão em medula óssea de TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-Mpl

Positividade (%)	**Intensidade (%)**
0 - Negativo (0-10%)	0 - Negativo
1 - Discreto (11-25%)	1 - Fraco
2 - Intermediário (26-50%)	2 - Moderado
3 - Extensivo	3 - Forte
Escore: (positividade) x (intensidade)	

4.4.13 Extração e avaliação da qualidade do DNA genômico de sangue periférico

Para obter maior concentração de DNA, 1,0 mL das amostras de sangue foram previamente submetidas à lise celular com 900,0 µL do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, $MgCl_2$ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%, seguido de centrifugação por 5 minutos a 5200 rotações por minuto (RPM). Em seguida, o DNA genômico foi extraído segundo o protocolo do fabricante do *QIAAMP DNA BLOOD MINI kit* (PreAnalytix/Qiagen, Germany).

A integridade das amostras de DNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com GelRed™. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260nm}/ A_{280nm}, usando-se o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

4.4.14 Quantificação dos alelos (allele burden) JAK2V617F

A quantificação da mutação *JAK2V617F* foi realizada no Instituto Fleury, pelo método de PCR em tempo real com sondas *Taqman*® MGB específicas para os alelos selvagem e mutado. Empregou-se o equipamento ABI 7900HT Viia7 (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA), seguindo a metodologia descrita por dos Santos *et al.*, (2014). Os primers e sondas usados estão descritos na **Tabela 10**.

Para a quantificação dos alelos, foi analisada a porcentagem de alelos mutados, estimada baseando-se nos sinais fluorescentes normalizados do alelo mutante (Rn mutante) e do alelo selvagem (Rn selvagem), localizados na região da amplificação exponencial da PCR e apresentados como porcentagem de mutação ou negativos:

% mutação *JAK2V617F* = Rn mutante/ (Rn mutante + Rn selvagem)

Tabela 10 - Características dos prímers e sondas Taqman® empregados para quantificação dos alelos *JAK2V617F*

Primer / Sonda	Sequência
Primer *Forward* (JAK2_198_P1)	5'- GCAGCAAGTATGATGAGCAAGCT – 3'
Primer *Reverse* (JAK2_302_P2)	5' – GGCATTAGAAAGCCTGTAGTTTTACTTAC – 3'
Sonda para o alelo selvagem *(JAK_WT_FAM)*	TGGAGTATGTGTCTGTGGA
Sonda para o alelo mutado *(JAK_MT_VIC)*	TGGAGTATGTTTCTGTGGAG

4.4.15 Detecção das mutações W515K e W515L no gene MPL nos pacientes negativos para a mutação JAK2V617F

A detecção das mutações *MPL W515L* e *W515L* foram realizadas no Instituto Fleury, por PCR em tempo real empregando-se sondas *Taqman*® MGB específicas para os alelos selvagem e mutados, conforme metodologia descrita por dos Santos e colaboradores (2014). O equipamento empregado foi o Rotor Gene 3000 (Corbett Research – Qiagen). Os primers e sondas usados estão descritos na **Tabela 11.**

Tabela 11 - Características dos primers e sondas Taqman® empregados para detecção das mutações *MPLW515K/L*

Prímer/ Sonda	Sequência
Primer *Forward*	5' – TGGTGACCGCTCTGCATCTA – 3'
Primer *Reverse*	5' – TCCACCGCCAGTCTCCTG – 3'
Sonda *MPL WT_VIC_MGB*	5' – VIC – TGAGGTGGCAGTTTC – 3 NFQ-MGB – 3'
Sonda *W515L_FAM_MGB*	5' – 6FAM – CTGCTGAGGTTGCAGTT – NFQ-MGB- 3'
Sonda *W515K_FAM_MGB*	5' – 6FAM – CTGCTGAGGAAGCAGT – NFQ-MGB -3'

4.4.16 Amplificação e sequenciamento do gene CALR

As análises do gene *CALR* foram realizadas pelos pesquisadores Miguel Mitne Neto e Marcos Tadeu dos Santos, no Instituto Fleury.

Com base no manuscrito de Tefferi, Lasho, Finke, Knudson*, et al.* (2014), foram desenhados primers para a amplificação do exon 9 do gene *CALR*, de modo que a região alvo estivesse contida em um único amplicon, com as seguintes modificações: (1) à porção 5' do primer *forward* foi anexada uma sequência M13F (-21) e (2) à porção 5' do primer *reverse* foi anexada uma sequência M13R, conforme apresentado na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Características dos primers empregados para a amplificação da região alvo no gene *CALR*

Prímer	Sequencia 5'>3'
Forward	TGTAAAACGACGGCCAGTCTGGCACCATCTTTGACAACTT
Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGGCCTCTCTACAGCTCGTC

As reações de PCR foram preparadas com 10,0 µL de PCR Mix (2x) (Promega), 0,15 µM de primers (forward e reverse), água MilliQ suficiente para 20 µL e 5,0 µL de DNA. As condições de ciclagem usadas foram: 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C e 30 segundos a 72°C; apenas um ciclo de 10 minutos a 72°C, mantendo por 4°C em seguida.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2%, e em seguida purificados por meio do kit Illustra GFX (GE Healthcare, Little Chalfont/Buckinghamshire, Reino Unido). Em seguida, esses produtos foram empregados para a reação de sequenciamento. Para cada reação foram usados 2,0 µL de BigDye Terminator v3.1, 2,0 µL de BigDye Buffer v3.1 (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA), 1,0 µL de primer M13F ou M13R, 1,0 µL de QSolution (QIAGEN, Aarrhus, Dinamarca) e 4,0 µL de amostra. A ciclagem para essa reação foi de 5 minutos a 95°C, seguidos por 25 ciclos de 30 segundos a 96°C, 20 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C, permanecendo a 4°C em seguida. A análise do sequenciamento de Sanger foi realizada em eletroforese capilar no equipamento Applied Biosystems 3130, conforme instruções do fabricante.

Os resultados foram avaliados com o auxílio da ferramenta de bioinformática CLC Bio Workbench (Qiagen, Aarrhus, Denmark) e a estrutura secundária da proteína original

foi predita pelo EMBOSS Transeq (EMBL-EBI, UK) http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/ e JPRED.

4.4.17 Análises Estatísticas

O banco de dados e as análises estatísticas foram realizados com o emprego do *software* SPSS versão 17.0 (IBM, EUA), enquanto os gráficos foram obtidos pelo programa GraphPad versão 5.00 (GraphPad Software, EUA). O nível de significância adotado foi de 5% ($p<0,05$).

As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses, e para a comparação dos grupos para as diversas variáveis foi usado o teste Qui Quadrado, o teste exato de Fisher ou *Likelihood ratio*.

As variáveis numéricas (concentrações dos marcadores plasmáticos de angiogênese, expressões gênicas e de miRNAs e resultados das análises imunoistoquímicas) foram apresentadas como mediana e intervalo interquartílico (P25-P75); e para a comparação dos grupos para as diversas variáveis foi usado o teste Mann-Whitney.

Foram realizados modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e expressões gênicas (RNAm e proteína) de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2*, RNAm de *SMADs 1* a *7* e expressões de miRNAs, além de modelos de correlações de Spearman entre expressões de RNAm de *TGFB1* e expressões gênicas (RNAm e proteína) de *VEGFA* e *FGF2*, RNAm de *SMADs 1* a *7* e expressões de miRNAs.

Os dados das concentrações plasmáticas de TGF-β1 não apresentaram distribuição normal, e, portanto, foram transformados em log10, havendo a correção da distribuição. A distribuição da expressão de RNAm de *TGFB1* não foi corrigida com a transformação logarítmica. Modelos de regressão linear simples usando o log10 da concentração plasmática de TGF-β1 como variável dependente foram realizados. As variáveis independentes empregadas foram as concentrações plasmáticas e expressões de RNAm de *VEGFA* e *FGF2* e as expressões de RNAm de *SMADs 1* a *7*. Os modelos de regressão linear que apresentaram nível de significância até 20% ($p<0,20$) foram selecionados para a realização dos modelos de regressão linear multivariada, cujos modelos incluíram as variáveis independentes: no grupo de MF:concentração plasmática de VEGFA, expressões de RNAm de *TGFB1*, *SMAD1* e *SMAD6*; no grupo de MFP:

expressões de RNAm de *VEGFA* e *SMAD3*; no grupo de MFPTE: concentração plasmática de VEGFA e expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA*, *SMAD5*, *SMAD6* e *SMAD7*.

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais, clínicas e hematológicas dos pacientes com MFP, MFPTE e TE e controles

As classificações e distribuições dos pacientes e controles incluídos no presente estudo estão apresentadas na **Figura 8**. Dois indivíduos **c**ontroles foram excluídos por apresentarem alterações no hemograma, porém nenhum dos indivíduos selecionados para compor esse grupo apresentou alteração na PCRus.

As características gerais e clínicas desses indivíduos estão dispostas na **Tabela 13**. Os grupos de pacientes com MFP e MFPTE apresentaram menor índice de massa corporal (IMC) em relação a seus controles (p=0,009 e p=0,047, respectivamente), enquanto 14,3% dos pacientes com MFP, 4,8% dos pacientes com MFPTE e 12,5% dos pacientes com TE apresentaram emagrecimento (dados não apresentados na tabela). Além disso, foi encontrada maior frequência de indivíduos com hipertensão nos pacientes com TE em comparação com seus controles (p=0,026).

Os dados hematológicos e concentrações de PCRus estão expostos na **Tabela 14.** Os grupos de pacientes com MFP, MFPTE e TE apresentaram menores contagens de hemácias do que seus controles (p=0,005, p=0,002 e p<0,001, respectivamente), e as concentrações de hemoglobina foram menores nos pacientes com MFP (p=0,008). Os pacientes com TE exibiram maiores valor corpuscular médio (VCM) (p<0,001) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (p=0,001) do que seus controles. Todos os grupos de paciente apresentaram maiores valores de variação de tamanho (RDW) (MFP: p<0,001; MFPTE: p<0,001 e TE: p=0,031) e maiores contagens de plaquetas em relação aos seus controles (MFP: p=0,015; MFPTE: p<0,001 e TE: p<0,001).

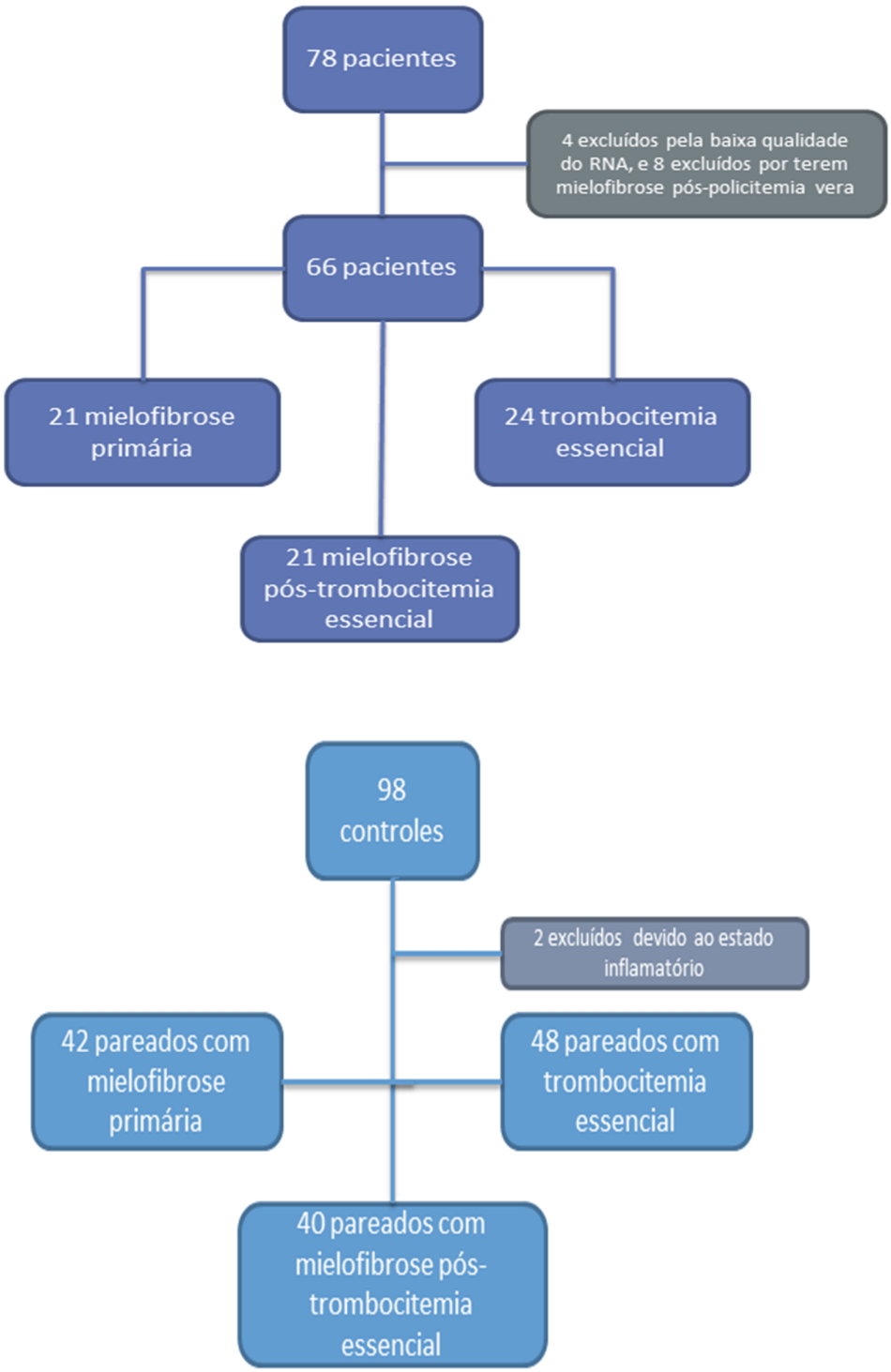

Figura 8 - Esquema representativo das classificações de pacientes e controles incluídos no estudo.
Os pacientes com mielofibrose pós-policitemia vera foram excluídos para reduzir a heterogeneidade de grupos de pacientes.

Tabela 13 - Características gerais e clínicas dos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e dos seus respectivos controles

Variáveis	MFP (N=21)	CONTROLE (N=42)	P valor	MFPTE (N=21)	CONTROLE (N=40)	P valor	TE (N=24)	CONTROLE (N=48)	P valor
Idade (anos)	62 (56-76)	62 (56-76)	0,901†	66 (54-75)	63 (54-73)	0,649†	66 (49-73)	65 (50-72)	0,981†
Gênero masculino	10 (47,0)	20 (47,6)	1,000*	8 (38,1)	14 (35,0)	0,811*	9 (37,5)	18 (37,5)	1,000*
IMC (kg/m^2)	24,7 (21,5-26,7)	26,4 (23,8-29,1)	**0,009**†	23,9 (20,8-27,4)	26,3 (23,7-29,2)	**0,047**†	25,0 (22,7-27,6)	25,9 (23,5-28,3)	0,423†
Presença de diabetes	2 (9,5)	7 (16,7)	0,705**	3 (14,3)	5 (12,5)	1,000**	3 (13,6)	4 (8,3)	0,670**
Presença de hipertensão arterial	11 (52,4)	20 (47,6)	0,722*	11 (52,4)	15 (37,5)	0,264*	12 (54,5)	13 (27,1)	**0,026***
Presença de eventos trombóticos	2 (9,5)	2 (4,8)	0,595**	2 (9,5)	0 (0)	0,115**	2 (8,7)	1 (2,1)	0,243**
Presença de esplenomegalia	6 (35,3)			6 (28,6)			2 (13,3)		
Tempo de uso de hidroxicarbamida (meses)	7,0 (0-49,0)			9,0 (0-28,0)			59,0 (1,3-95,5)		
Tempo de doença (meses)	29,0 (5,0-82,5)			26,0 (14,5-54,5)			64,0 (24,2-100,5)		
Presença de *JAK2V617F*	11 (52,4)			12 (57,1)			13 (54,2)		
Carga alélica *JAK2V617F*	25,5 (9,0-39,4)			9,9 (9,0-57,4)			9,0 (9,0-23,6)		
Presença de *MPL W515L*	0 (0)			0 (0)			1 (4,2)		
Presença de mutação *CALR*	8 (38,1)			7 (33,3)			3 (12,5)		

MFP: mielofibrose primária, MF pós-TE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial, TE: trombocitemia essencial. As variáveis numéricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartílico (P25-P75); para a comparação dos grupos foi usado o teste de Mann-Whitney (†). As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses; para a comparação dos grupos foi usado o teste do Qui quadrado (*) ou teste exato de Fisher (**). As medianas das cargas alélicas da mutação *JAK2V617F* foram calculadas apenas para as amostras positivas para essa mutação.

Tabela 14 - Dados hematológicos e de proteína C reativa ultrassensível dos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e dos seus respectivos controles

	MFP (N=21)	CONTROLE (N=42)	P valor	MFPPTE (N=21)	CONTROLE (N=40)	P valor	TE (N=24)	CONTROLE (N=48)	P valor
Hemácias ($x10^6$ /mm^3)	3,9 (3,3-4,9)	4,7 (4,5-5,0)	**0,005**	4,2 (3,5-4,8)	4,7 (4,4-5,0)	**0,002**	3,6 (3,3-4,7)	4,8 (4,3-5,1)	**<0,001**
Hemoglobina (g/dL)	12,2 (10,1-15,5)	14,3 (13,2-15,4)	**0,008**	13,3 (12,5-15,1)	14,4 (13,4-1,0)	0,121	13,7 (12,1- 14,8)	14,1 (13,1-15,4)	0,158
Hematócrito (%)	36,2 (29,7-45,3)	41,9 (39,1-44,5)	**0,008**	40,0 (35,9-44,2)	42,2 (39,0-44,3)	0,139	40,4 (35,3-42,8)	41,5 (38,0-45,1)	0,215
VCM (fL)	87,2 (83,4-95,2)	89,3 (86,0-92,8)	0,662	93,7 (86,3-104,7)	89,2 (87,5-92,0)	0,050	100,3 (88,9-110,5)	87,8 (83,1-90,1)	**<0,001**
HCM (pg)	29,9 (28,1-32,5)	30,7 (28,9-31,6)	0,694	34,2 (28,9-36,4)	30,7 (29,6-31,3)	0,072	33,7 (29,6-38,2)	29,8 (28,4-30,8)	**0,001**
CHCM (g/dL)	34,0 (33,6-34,8)	34,1 (33,6-34,6)	0,913	34,0 (33,7-34,4)	34,1 (33,6-34,6)	0,843	33,8 (33,1-34,4)	34,1 (33,4-34,6)	0,273
RDW (%)	18,1 (15,5-21,2)	13,3 (12,8-13,9)	**<0,001**	16,4 (13,9-18,1)	13,3 (13,1-14,0)	**<0,001**	14,0 (13,2-14,9)	13,4 (12,9-13,9)	**0,031**
Leucócitos ($x10^3$ /mm^3)	7,5 (5,7-13,1)	6,3 (5,1-8,2)	0,210	8,2 (5,0-10,9)	6,3 (5,0-7,3)	0,103	7,3 (5,3-9,9)	6,8 (4,9-8,0)	0,117
Plaquetas ($x10^3$ /mm^3)	423 (107-710)	219 (168-256)	**0,015**	430 (235-650)	201 (184-242)	**<0,001**	569 (364-681)	217 (189-242)	**<0,001**
PCRus (mg/dL)	0,27 (0,06-0,35)	0,13 (0,06-0,37)	0,385	0,12 (0,45-0,24)	0,18 (0,06-0,38)	0,131	0,20 (0,09-0,72)	0,21 (0,07-0,46)	0,484

MFP: mielofibrose primária, MF pós-TE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial, TE: trombocitemia essencial. PCRus: Proteína C reativa ultrassensível.
Os valores são mediana e intervalo interquartílico (P25-P75). Foi usado o teste de Mann-Whitney. VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: *red cell distribution width* (variação de tamanho).

5.2 Avaliação do prognóstico dos pacientes com MFP

O prognóstico dos pacientes com MFP foi analisado baseando-se no DIPSS-Plus, um sistema de pontuação que avalia oito fatores de risco independentes e que pode ser aplicado durante o curso da doença, conforme anteriormente exposto (**item 2.2.1**; **Tabelas 1 e 2**). Na **Tabela 15** estão dispostas as frequências dos escores da classificação de risco DIPSS-Plus dos pacientes com MFP. Apenas dois pacientes apresentaram risco alto, enquanto os demais se distribuíram dentre os outros escores.

Tabela 15 - Classificação de risco DIPSS-Plus dos pacientes com mielofibrose primária

Escore	Frequência (%)
Baixo	6 (28,6)
Intermediário 1	6 (28,6)
Intermediário 2	7 (33,4)
Alto	2 (9,5)

Os dois pacientes que apresentaram alto risco DIPSS-Plus tinham CARIÓTIPO NORMAL. A seguir estão apresentadas as características gerais e clínicas de cada um desses dois pacientes.

O paciente MFTE14 apresentou a mutação *CALR 1092_1143_del* (mutação tipo 1; p.L367fs*46), gênero masculino, 59 anos, com 79 meses de duração da doença, e usava hidroxicarbamida há 50 meses (1.500 mg/dia). Os fatores de risco por ele apresentados eram concentração de hemoglobina menor que 10 g/dL, presença de blastos no sangue periférico, perda de peso, e contagem de plaquetas abaixo de 100 $x10^3$ $/mm^3$.

O outro paciente (MFTE46) apresentou a mutação *JAK2V617F*, com carga alélica de 72,9%. Gênero masculino, com 76 anos, com sete meses de diagnóstico da doença e usando a hidroxicarbamida há 50 meses (500 mg/dia), Os fatores de risco por ele apresentados eram idade maior que 65 anos, presença de blastos no sangue periférico, perda de peso e contagem de plaquetas abaixo de 100 $x10^3$ $/mm^3$.

5.2.1 Correlação entre carga alélica da mutação JAK2V617F e risco DIPSS-Plus em pacientes com MFP

Com intuito de verificar se existe correlação entre a carga alélica da mutação *JAK2V617F* e o risco DIPSS-Plus em pacientes com MFP, foi realizado um modelo de correlação de Spearman empregando-se essas variáveis. Não foi observada correlação entre a carga alélica e o risco DIPSS-Plus nos pacientes com MFP (r=0,585; p=0,059; n=11).

5.3 Pacientes com cariótipo alterado

O cariótipo foi obtido com sucesso de 50 dos 66 pacientes incluídos nas análises, não tendo sido possível avaliar o cariótipo de 6 pacientes com MFP, 4 com MFPTE e 6 com TE. Foram encontrados dois pacientes com CARIÓTIPO ALTERADO. As principais características desses pacientes estão apresentadas a seguir.

O paciente MFTE09, do gênero masculino, tinha diagnóstico de MFPTE, e seu cariótipo foi 46,XY del20q(11.2)[5]. Sua idade, de 61 anos, estava próxima às dos demais (66 anos), e seu IMC de 26,1 kg/m^2 também era próximo à mediana de 23,9 kg/m^2 dos pacientes com MFPTE. Era hipertenso, e sua concentração de PCRus de 0,03 mg/ dL foi menor do que a mediana do grupo (0,12 mg/ dL). Seu tempo de doença (47 meses) e tempo de uso de hidroxicarbamida (22 meses; 1000 mg/ dia) foram bem maiores do que a mediana dos demais (26 meses, 9 meses, respectivamente). Esse paciente era positivo para a mutação *JAK2V617F*, e sua carga alélica era de 70,77%, muito acima da mediana de seu grupo (9,9%). Além disso, e as alterações apresentadas no hemograma desse paciente foram: RDW aumentado, leucopenia e plaquetopenia discretas.

O paciente MFTE44, do gênero feminino, tinha diagnóstico de MFP, e seu cariótipo foi 46,XX, del(20)(q4q13)[2]/ 46,XX[15], apresentando risco DIPSS-Plus intermediário 2. Sua idade, de 80 anos, era bastante avançada em relação à mediana do grupo (60 anos), e seu IMC de 30,4 kg/m^2 era maior do que a mediana dos pacientes com MFP (24,7 kg/m^2).Era hipertensa, e sua concentração de PCRus

de 0,15 foi menor em relação à mediana do seu grupo (0,27 mg/dL). Seu tempo de doença (24 meses) era próximo à mediana dos demais (29 meses), embora o tempo de uso de hidroxicarbamida (23 meses) tenha sido bem maior do que a mediana do seu grupo (7 meses). Essa paciente era positiva para a mutação *JAK2V617F*, e sua carga alélica era de 79,67%, muito acima da mediana de seu grupo (25,5%). Essa paciente ainda apresentou aumento do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito, além de leucocitose acentuada e plaquetose discreta.

5.4 Comparações entre as concentrações dos marcadores plasmáticos de angiogênese (TGF-β1, VEGFA e FGF2) nos pacientes com MFP, MFPTE e TE e nos seus respectivos controles

As concentrações plasmáticas de TGF-β1 dos grupos de MFP, MFPTE e TE não foram diferentes dos seus respectivos controles (**Figuras 9A, 9B e 9A**), embora os pacientes com TE tenham apresentado tendência em direção a maiores concentrações de TGF-β1 (p=0,077). As concentrações de VEGFA, por outro lado, foram maiores nos pacientes com MFP (p=0,030, **Figura 9C**), MFPTE (p=0,002, **Figura 9D**) e TE (p=0,002, **Figura 10B**) do que em seus controles, assim como as concentrações de FGF2 (p=0,005, **Figura 9E**; p<0,001, **Figura 9F**; P<0,001, **Figura 10C**, respectivamente).

.

A)

B)

C)

D)

E)

F)

Figura 9 - Concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2 nos pacientes com mielofibrose primária (A, C e E) e mielofibrose pós-trombocitemia essencial (B, D e F) e nos seus respectivos controles.

MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial. As concentrações dos analitos entre cada grupo de pacientes e seus respectivos controles foram comparadas usando-se o teste Mann-Whitney.

A)

B)

C)

Figura 10 - Concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2 nos pacientes com trombocitemia essencial e nos seus controles.
TE: trombocitemia essencial. As concentrações dos analitos entre os dois grupos foram comparadas usando-se o teste Mann-Whitney.

5.5 Comparações entre as expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA*, *FGF2* e de *SMADs 1* a *7* e de miRNAs 193a-5p, 369-5p, 542-5p, 590-3p e 590-5p nos pacientes com MFP, MFPTE e TE e nos seus respectivos controles

Não foram encontradas diferenças nas expressões de RNAm dos genes *TGFB1* (**Figuras 11A**, **11B** e **12A**) e *VEGFA* (**Figuras 11C**, **11D** e **12B**) entre os grupos de pacientes e controles, embora os pacientes com TE tenham apresentado tendência a maiores expressões de *TGFB1* (p=0,057). As expressões de RNAm de *FGF2* foram maiores nos pacientes com MFP (p<0,001, **Figura 11E**), MFPTE (p<0,0001, **Figura 11F**) e TE (p<0,001, **Figura 12C**) do que em seus controles. As

expressões de RNAm de *SMADs* e de miRNAs foram semelhantes entre pacientes e controles.

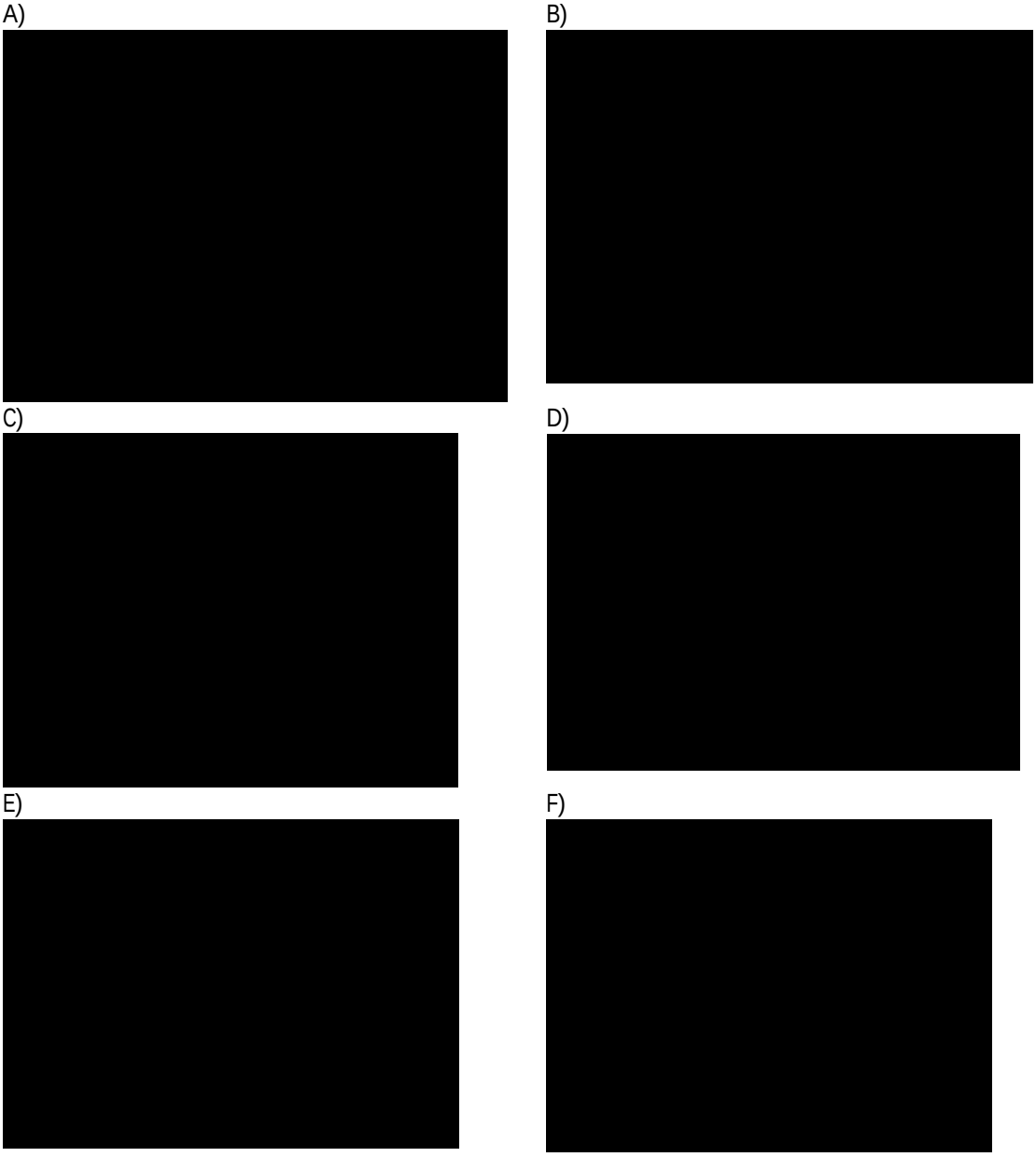

Figura 11 - Expressões de RNAm dos genes *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* nos pacientes com mielofibrose primária (A, C e E) e mielofibrose pós-trombocitemia essencial (B, D e F) e nos seus respectivos controles.
MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial. As expressões de RNAm entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney.

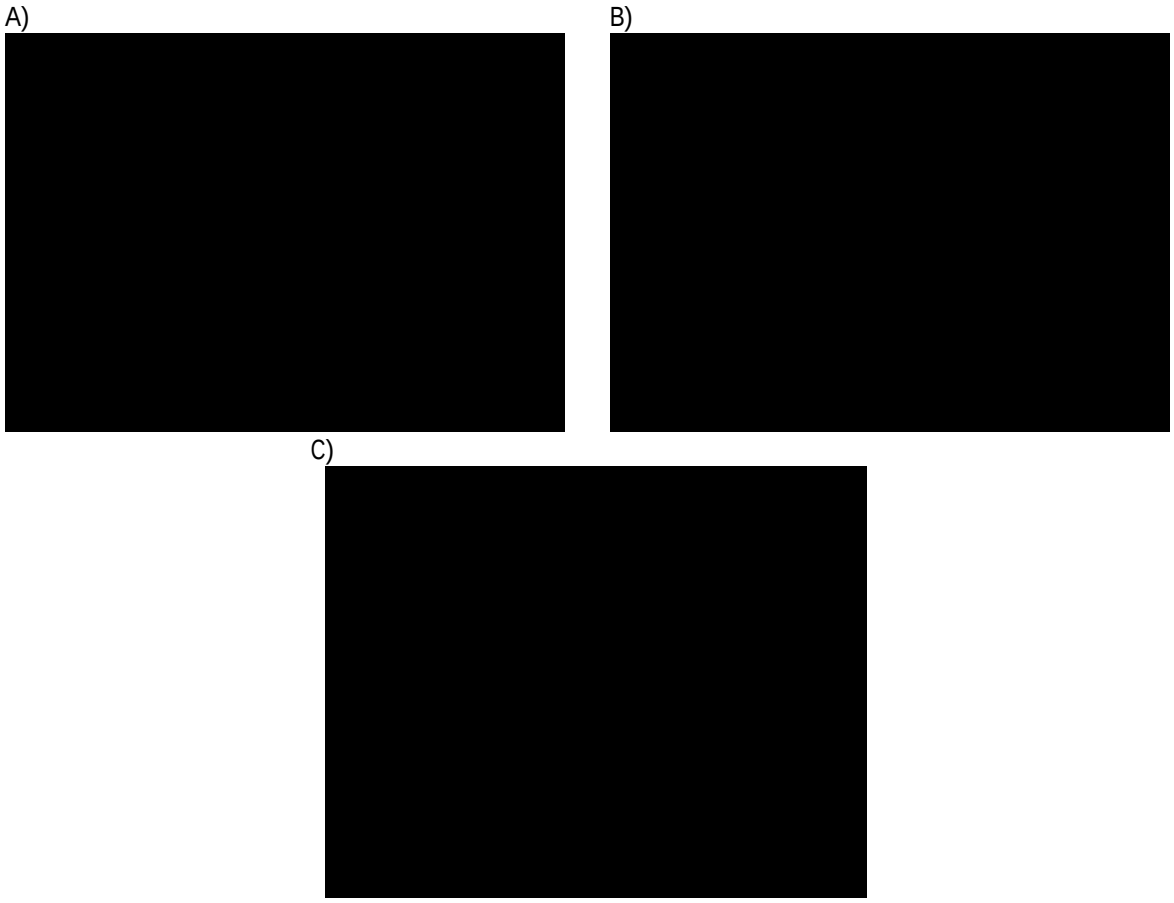

Figura 12 - Expressões de RNAm dos genes *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* nos pacientes com trombocitemia essencial e no grupo controle.
TE: trombocitemia essencial. As expressões de RNAm entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney.

5.6 Modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e expressões gênicas (RNAm e proteína) de *TGF-β1*, *VEGFA* e *FGF2*, RNAm de *SMADs 1* a *7* e expressões de miRNAs nos pacientes e controles

Os modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e expressões gênicas (RNAm e proteína) de *TGF-β1*, *VEGFA* e *FGF2*, RNAm de *SMADs* 1 a 7 e expressões de miRNAs estão dispostos nas **Tabelas 16**, **17** e **18**.

As concentrações plasmáticas de TGF-β1 correlacionaram-se positivamente às de VEGFA em todos os grupos de pacientes e controles. Foram encontradas correlações positivas entre as concentrações plasmáticas de TGF-β1 e de FGF2 nos pacientes com MFP, e correlações negativa entre essas variáveis nos seus controles, assim como nos controles de MFPTE.

Tabela 16 - Modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e de VEGFA e FGF2 nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles

TGF-β1 plasmático / Grupos	**VEGFA plasmático**	**FGF2 plasmático**
MFP	r=0,592 **p=0,005** n=21	r=0,556 **p=0,009** n=21
Controle MFP	r=0,455 **p=0,002** n=42	r=-0,310 **p=0,045** n=42
MFPTE	r=0,493 **p=0,023** n=21	r=0,010 p=0,966 n=21
Controle MFPTE	r=0,400 **p=0,011** n=40	r=-0,318 **p=0,015** n=40
TE	r=0,415 **p=0,044** n=24	r=0,202 p=0,345 n=24
Controle TE	r=0,503 **p<0,001** n=48	r=-0,246 p=0,092 n=48

MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial; TE: trombocitemia essencial.

Correlações negativas entre TGF-β1 plasmático e as expressões de RNAm de *SMADs 2* e *3* foram observadas nos pacientes com MFP, enquanto nos seus controles foram encontradas correlações entre o TGF-β1 plasmático e as expressões de RNAm de *SMADs 2* e *7*. Não foram observadas correlações entre as concentrações plasmáticas de TGF-β1 e as expressões de RNAm de *SMADs* nos pacientes com MFPTE e TE, nem em seus respectivos controles.

Tabela 17 - Modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e RNAm de *VEGFA*, *FGF2*, e *SMADs 1* a *7* nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles

TGF-β1 plasmático / Grupos	**RNAm *VEGFA***	**RNAm *FGF2***	**RNAm *SMAD1***	**RNAm *SMAD2***	**RNAm *SMAD3***	**RNAm *SMAD4***	**RNAm *SMAD5***	**RNAm *SMAD6***	**RNAm *SMAD7***
MFP	r=-0,155 p=0,504 n=21	r=-0,057 p=0,806 n=21	r=-0,421 p=0,058 n=21	r=-0,449 **p=0,041** n=21	r=-0,612 **p=0,003** n=21	r=-0,308 p=0,186 n=20	r=-0,433 p=0,056 n=20	r=-0,035 p=0,880 n=21	r=-0,418 p=0,059 n=21
Controle MFP	r=-0,083 p=0,601 n=42	r=-0,054 p=0,734 n=42	r=-0,242 p=0,123 n=42	r=-0,380 **p=0,014** n=41	r=-0,144 p=0,364 n=42	r=-0,167 p=0,291 n=42	r=-0,189 p=0,232 n=42	r=-0,054 p=0,733 n=42	r=-0,319 **p=0,042** n=41
MFPTE	r=0,256 p=0,263 n=21	r=-0,098 p=0,682 n=20	r=0,235 p=0,305 n=21	r=-0,042 p=0,858 n=21	r=-0,204 p=0,375 n=21	r=0,112 p=0,630 n=21	r=-0,068 p=0,771 n=21	r=0,286 p=0,209 n=21	r=0,114 p=0,622 n=21
Controle MFPTE	r=0,022 p=0,891 n=40	r=-0,074 p=0,649 n=40	r=-0,108 p=0,508 n=40	r=-0,262 p=0,107 n=39	r=-0,035 p=0,828 n=40	r=-0,006 p=0,973 n=40	r=-0,064 p=0,693 n=40	r=0,106 p=0,516 n=40	r=-0,240 p=0,141 n=39
TE	r=-0,382 p=0,666 n=24	r=0,128 p=0,552 n=24	r=-0,139 p=0,517 n=24	r=-0,208 p=0,330 n=24	r=-0,205 p=0,336 n=24	r=-0,097 p=0,654 n=24	r=-0,294 p=0,163 n=24	r=-0,137 p=0,525 n=24	r=-0,065 p=0,762 n=24
Controle TE	r=-0,207 p=0,159 n=48	r=-0,100 p=0,498 n=48	r=-0,135 p=0,359 n=48	r=-0,277 p=0,056 n=48	r=-0,155 p=0,293 n=48	r=-0,258 p=0,076 n=48	r=-0,203 p=0,166 n=48	r=0,090 p=0,543 n=48	r=-0,188 p=0,201 n=48

MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial; TE: trombocitemia essencial.

Em relação ao miRNAs, houve correlação positiva entre a concentração plasmática de TGF-β1 e a expressão do miR-193a-5p nos controles de MFP, mas não nos pacientes. Foi encontrada correlação positiva entre o TGF-β1 plasmático e a expressão do miR-193a-5p nos controles de MFPTE, e nos pacientes houve correlação negativa entre essa citocina e a expressão do miR-542-5p. O TGF-β1 plasmático correlacionou-se positivamente às expressões de miR-193a-5p e miR-542-5p nos pacientes com TE, enquanto nos seus controles foi encontrada correlação positiva entre o TGF-β1 plasmático e a expressão do miR-590-5p.

Tabela 18 - Modelos de correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de TGF-β1 e expressões de miRNAs nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles

TGF-β1 plasmático / Grupos	**miR-193a-5p**	**miR-369-5p**	**miR-542-5p**	**miR-590-3p**	**miR-590-5p**
MFP	r=0,253 p=0,345 n=16	r=-0,038 p=0,888 n=16	r=0,185 p=0,492 n=16	r=0,500 p=0,207 n=8	r=0,066 p=0,831 n=13
Controle MFP	r=0,762 **p=0,028** n=8	r=0,143 p=0,736 n=8	r=-0,048 p=0,911 n=8	r=-0,200 p=0,747 n=5	r=0,333 p=0,420 n=8
MFPTE	r=-0,119 p=0,779 n=8	r=-0,119 p=0,779 n=8	r=-0,893 **p=0,007** n=7	* * n=3	r=-0,200 p=0,704 n=6
Controle MFPTE	r=0,683 **p=0,042** n=9	r=0,633 p=0,067 n=9	r=0,405 p=0,320 n=8	r=-0,200 p=0,704 n=6	r=0,357 p=0,432 n=7
TE	r=0,780 **p=0,002** n=13	r=-0,055 p=0,859 n=13	r=0,643 **p=0,018** n=13	r=0,300 p=0,624 n=5	r=-0,345 p=0,328 n=10
Controle TE	r=0,326 p=0,301 n=12	r=0,028 p=0,931 n=12	r=0,068 p=0,842 n=11	r=0,750 p=0,052 n=7	r=0,742 **p=0,014** n=10

MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial; TE: trombocitemia essencial. * Apenas três amostras desse grupo foram analisadas, portanto, não foi possível realizar a análise estatística.

5.7 Modelos de correlações de Spearman entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e expressões gênicas (RNAm e proteína) de *VEGFA* e *FGF2*, RNAm de *SMADs* 1 a 7 e expressões de miRNAs nos pacientes e controles

Os modelos de correlações de Spearman entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e expressões gênicas (RNAm e proteína) de *VEGFA* e *FGF2*, RNAm de *SMADs* 1 a 7 e expressões de miRNAs estão apresentados nas **Tabelas 19**, **20** e **21.**

Não foram encontradas correlações entre a expressão de RNAm de *TGFB1* e as concentrações plasmáticas de VEGFA, FGF2 e TGF-β1 nos pacientes e controles, nem entre a expressão de RNAm de *TGFB1* e de *VEGFA* e *FGF2* em nenhum dos grupos de pacientes, embora tal correlação tenha sido demonstrada em todos os grupos de controles.

Tabela 19 - Modelos de correlações de Spearman entre expressões de RNAm de *TGFB1* e concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2 nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles

RNAm *TGFB1* / Grupos	**TGF-β1 plasmático**	**VEGFA plasmático**	**FGF2 plasmático**
MFP	r=-0,158 p=0,493 n=21	r=-0,073 p=0,752 n=21	r=-0,029 p=0,902 n=21
Controle MFP	r=-0,259 p=0,098 n=42	r=0,053 p=0,739 n=42	r=0,098 p=0,538 n=42
MFPTE	r=0,344 p=0,127 n=21	r=0,071 p=0,758 n=21	r=-0,217 p=0,345 n=21
Controle MFPTE	r=-0,182 p=0,260 n=40	r=0,188 p=0,244 n=40	r=0,130 p=0,425 n=40
TE	r=0,109 p=0,613 n=24	r=0,310 p=0,140 n=24	r=0,351 p=0,093 n=24
Controle TE	r=-0,113 p=0,446 n=48	r=-0,113 p=0,412 n=48	r=0,063 p=0,672 n=48

MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial; TE: trombocitemia essencial.

Foram encontradas correlações entre a expressão de RNAm de *TGFB1* e as expressões de RNAm de *SMADs 1*, *2*, *3*, *4*, *5* e *7* nos pacientes com MFP. Nos pacientes com MFPTE, essas correlações foram observadas com *SMADs 1*, *6* e *7*, enquanto nos pacientes com TE, as correlações foram com os *SMADs 4* e *7*. Em todos os grupos de controles foram demonstradas correlações entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e de *SMADs 1* a *7*.

Tabela 20 - Modelos de correlações de Spearman entre expressões de RNAm de *TGFB1* e de *VEGFA*, *FGF2* e *SMADs 1* a *7* nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles

RNAm *TGFB1* / Grupos	**RNAm *VEGFA***	**RNAm *FGF2***	**RNAm *SMAD1***	**RNAm *SMAD2***	**RNAm *SMAD3***	**RNAm *SMAD4***	**RNAm *SMAD5***	**RNAm *SMAD6***	**RNAm *SMAD7***
MFP	r=0,283 p=0,214 n=21	r=0,397 p=0,074 n=21	r=0,623 **p=0,003** n=21	r=0,761 **p<0,001** n=21	r=0,636 **p=0,002** n=21	r=0,651 **p=0,002** n=20	r=0,740 **p<0,001** n=20	r=0,162 p=0,482 n=21	r=0,738 **p<0,001** n=21
Controle	r=0,690 **p<0,001** n=42	r=0,675 **p<0,001** n=42	r=0,705 **p<0,001** n=42	r=0,703 **p<0,001** n=42	r=0,485 **p=0,001** n=42	r=0,616 **p<0,001** n=42	r=0,742 **p<0,001** n=42	r=0,526 **p<0,001** n=42	r=0,638 **p<0,001** n=41
MFPTE	r=0,155 p=0,504 n=21	r=-0,051 p=0,830 n=20	r=0,477 **p=0,029** n=21	r=0,340 p=0,131 n=21	r=0,166 p=0,471 n=21	r=0,338 p=0,134 n=21	r=0,391 p=0,080 n=21	r=0,483 **p=0,027** n=21	r=0,508 **p=0,019** n=21
Controle	r=0,398 **p=0,011** n=40	r=0,664 **p<0,001** n=40	r=0,608 **p<0,001** n=40	r=0,663 **p<0,001** n=39	r=0,372 **p=0,018** n=40	r=0,515 **p=0,001** n=40	r=0,614 **p<0,001** n=40	r=0,510 **p=0,001** n=40	r=0,569 **p<0,001** n=39
TE	r=0,231 p=0,277 n=24	r=0,367 p=0,078 n=24	r=0,173 p=0,419 n=24	r=0,366 p=0,079 n=24	r=0,163 p=0,448 n=24	r=0,439 **p=0,032** n=24	r=0,214 p=0,316 n=24	r=0,162 p=0,450 n=24	r=0,500 **p=0,013** n=24
Controle	r=0,542 **p<0,001** n=48	r=0,680 **p<0,001** n=48	r=0,671 **p<0,001** n=48	r=0,607 **p<0,001** n=48	r=0,454 **p=0,001** n=48	r=0,608 **p<0,001** n=48	r=0,702 **p<0,001** n=48	r=0,460 **p=0,001** n=48	r=0,622 **p<0,001** n=48

MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial; TE: trombocitemia essencial.

Em relação aos miRNAs, foram encontradas correlações negativas entre a expressão de RNAm de *TGFB1* a expressão de miR-542-5p e miR-590-3p nos pacientes com MFP. Nos seus controles, por outro lado, foi observada correlação positiva entre expressão de RNAm de *TGFB1* e miR-193a-5p. Nos pacientes com MFPTE foi encontrada correlação negativa entre expressão de RNAm de *TGFB1* e a expressão de miR-369-5p, e nenhuma correlação foi observada em seus controles. Foi demonstrada correlação positiva entre a expressão de RNAm de *TGFB1* e a expressão de miR-193a-5p nos pacientes com TE, enquanto nenhuma correlação foi observada em seus controles.

Tabela 21 - Modelos de correlações de Spearman entre expressões de RNAm de *TGFB1* e expressões de miRNAs nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles

RNAm *TGFB1* / Grupos	**miR-193a-5p**	**miR-369-5p**	**miR-542-5p**	**miR-590-3p**	**miR-590-5p**
MFP	r=-0,335 p=0,204 n=16	r=-0,418 p=0,107 n=16	r=-0,512 **p=0,043** n=16	r=-0,762 **p=0,028** n=8	r=-0,104 p=0,734 n=13
Controle	r=0,833 **p=0,010** n=8	r=0,548 p=0,160 n=8	r=0,595 p=0,120 n=8	r=-0,100 p=0,873 n=5	r=0,429 p=0,289 n=8
MFPTE	r=0,095 p=0,823 n=8	r=-0,810 **p=0,015** n=8	r=-0,500 p=0,253 n=7	* * n=3	r=-0,200 p=0,704 n=6
Controle	r=0,350 p=0,356 n=9	r=0,400 p=0,286 n=9	r=0,238 p=0,570 n=8	r=0,314 p=0,544 n=6	r=0,071 p=0,879 n=7
TE	r=0,720 **p=0,006** n=13	r=-0,044 p=0,887 n=13	r=0,434 p=0,138 n=13	r=0,600 p=0,285 n=5	r=-0,200 p=0,580 n=10
Controle	r=0,161 p=0,618 n=12	r=0,126 p=0,697 n=12	r=-0,091 p=0,790 n=11	r=0,321 p=0,482 n=7	r=0,042 p=0,907 n=10

MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial; TE: trombocitemia essencial. * Apenas três amostras desse grupo foram analisadas, portanto, não foi possível realizar a análise estatística.

5.8 Modelos de regressões lineares simples e multivariadas para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1 nos pacientes e controles segundo a expressão gênica de *VEGFA* e *FGF2*, e expressões de RNAm de *TGFB1* e *SMADs 1* a *7*

Foram realizados 12 modelos de regressões lineares simples para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1, usando como variáveis independentes as expressões gênicas de *VEGFA* e *FGF2*, e expressões de RNAm de *TGFB1* e *SMADs 1* a *7*, em pacientes com MFP (**Tabela 22)**, MFPTE (**Tabela 23**) e TE

(**Tabela 24**). Em seguida, as variáveis que apresentaram nível de significância de até 20% (p<0,20) foram selecionadas para os modelos de regressões lineares multivariadas.

No grupo de pacientes com MFP, nenhuma das variáveis foi associada às variações nos valores do log10 de TGF-β1 no modelo de regressão linear univariada ou multivariada (**Tabela 22**). No modelo de regressão linear univariada dos pacientes com MFPTE, o VEGFA plasmático foi associado às variações nos valores de log10 de TGF-β1 (p=0,004; **Tabela 23**) e essa variável permaneceu significativa no modelo multivariado (p=0,007). Nesses pacientes, a expressão de RNAm de *TGFB1* foi associada às variações nos valores do log10 de TGF-β1 apenas no modelo de regressão linear simples (p=0,027; **Tabela 23**). No grupo de pacientes com TE, por sua vez, os modelos de regressão linear univariada para VEGFA plasmático e RNAm de *SMAD6* foram associados às variações nos valores do log10 de TGF-β1 (p=0,005 e p=0,036, respectivamente), e apenas o VEGFA plasmático permaneceu significativo no modelo multivariado (p=0,034) (**Tabela 24**).

Tabela 22 - Modelos de regressões lineares simples e multivariadas para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1 nos pacientes com MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

Modelo	Variável independente	B	Erro padrão	P valor
Modelo univariado (n=21)				
	concentração plasmática			
1	FGF2	0,000	0,000	0,273
2	VEGFA	0,000	0,000	0,081
	expressão de RNAm			
3	*TGFB1*	- 0,642	0,654	0,339
4	*FGF2*	- 0,090	0,875	0,919
5	*VEGFA*	- 0,244	1,937	0,901
6	*SMAD1*	- 6,879	6,263	0,286
7	*SMAD2*	- 0,453	1,082	0,680
8	*SMAD3*	- 4,734	3,135	0,148
9	*SMAD4*	- 0,141	1,111	0,900
10	*SMAD5*	- 0,560	1,867	0,768
11	*SMAD6*	- 0,679	4,843	0,890
12	*SMAD7*	- 0,861	3,912	0,828
Modelo multivariado (n=21)				
	expressão de RNAm			
13	*VEGFA*	- 0,552	1,888	0,773
	SMAD3	- 4,837	3,233	0,152

As regressões lineares simples usando o log10 da concentração plasmática de TGF-β1 como variável dependente foram apresentadas nos modelos de 1 a 12. No modelo 13 foi apresentado um modelo linear multivariado para as variáveis que apresentaram até 20% de significância no modelo linear simples.

Tabela 23 - Modelos de regressões lineares simples e multivariadas para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1 nos pacientes com MIELOFIBROSE PÓS-TROMBOCITEMIA ESSENCIAL

Modelo	Variável independente	B	Erro padrão	P valor
Modelo univariado (n=21)				
	concentração plasmática			
1	FGF2	0,000	0,002	0,872
2	VEGFA	0,002	0,000	**0,004**
	expressão de RNAm			
3	*TGFB1*	0,647	0,271	**0,027**
4	*FGF2*	- 0,045	0,041	0,281
5	*VEGFA*	9,811	7,206	0,189
6	*SMAD1*	0,875	1,359	0,527
7	*SMAD2*	1,642	2,364	0,496
8	*SMAD3*	0,353	0,910	0,703
9	*SMAD4*	2,811	2,310	0,239
10	*SMAD5*	3,231	2,178	0,154
11	*SMAD6*	3,348	2,157	0,137
12	*SMAD7*	18,267	13,558	0,194
Modelo multivariado (n=21)				
	concentração plasmática			
	VEGFA	0,001	0,000	**0,007**
	expressão de RNAm			
	TGFB1	0,826	0,608	0,195
13	*VEGFA*	22,416	18,201	0,238
	SMAD5	- 9,127	12,863	0,490
	SMAD6	3,439	8,202	0,681
	SMAD7	- 3,286	37,134	0,931

As regressões lineares simples usando o log10 da concentração plasmática de TGF-β1 como variável dependente foram apresentadas nos modelos de 1 a 12. No modelo 13 foi apresentado um modelo linear multivariado para as variáveis que apresentaram até 20% de significância no modelo linear simples.

Tabela 24 - Modelos de regressões lineares simples e multivariadas para a variável dependente log10 da concentração plasmática de TGF-β1 nos pacientes com TROMBOCITEMIA ESSENCIAL

Modelo	Variável independente	B	Erro padrão	P valor
Modelo univariado (n=24)				
	concentração plasmática			
1	FGF2	0,006	0,004	0,187
2	VEGFA	0,001	0,000	**0,005**
	expressão de RNAm			
3	*TGFB1*	0,045	0,609	0,942
4	*FGF2*	- 4,231	2,956	0,166
5	*VEGFA*	1,704	6,614	0,799
6	*SMAD1*	- 14,493	9,263	0,132
7	*SMAD2*	- 0,847	0,484	0,094
8	*SMAD3*	- 5,818	4,909	0,249
9	*SMAD4*	$1,144^{-8}$	0,000	0,955
10	*SMAD5*	- 11,890	5,794	0,052
11	*SMAD6*	- 231,290	103,852	**0,036**
12	*SMAD7*	0,002	0,035	0,958
Modelo multivariado (n=24)				
	concentração plasmática			
13	FGF2	0,000	0,004	0,950
	VEGFA	0,001	0,000	**0,034**
	expressão de RNAm			
	FGF2	- 3,107	2,649	0,258
	SMAD1	15,910	25,227	0,537
	SMAD2	- 0,141	1,528	0,928
	SMAD5	- 7,867	9,908	0,439
	SMAD6	- 212,280	161,198	0,206

As regressões lineares simples usando o log10 da concentração plasmática de TGF-β1 como variável dependente foram apresentadas nos modelos de 1 a 12. No modelo 13 foi apresentado um modelo linear multivariado para as variáveis que apresentaram até 20% de significância no modelo linear simples.

5.9 Expressão gênica (RNAm e proteína) de TGF-β1 em pacientes segundo a intensidade de angiogênese

Para avaliar se a expressão gênica (RNAm e proteínas) de TGF-β1 é diferente em pacientes com menor ou maior angiogênese, foram formados dois subgrupos para cada grupo de pacientes, de acordo com as medianas das concentrações plasmáticas de VEGFA e FGF2 concomitantemente (**Tabela 25**). Aqueles que apresentaram valores discordantes para as concentrações dessas citocinas foram excluídos dessa análise.

Observou-se que os pacientes com MFP com maior angiogênese apresentavam maiores concentrações plasmáticas de TGF-β1 (p=0,014) e menor tempo de doença (p=0,022) em relação àqueles com menor angiogênese. Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis analisadas nos grupos de pacientes com MFPTE e TE.

Tabela 25 - Concentrações plasmáticas e expressões de RNAm de *TGFB1* em pacientes com valores de FGF2 e VEGFA plasmáticos concomitantemente menores ou maiores que a mediana

	MFP			**MFPTE**			**TE**		
Variáveis	FGF2 <19,26 e VEGFA <76,38 N=6	FGF2 ≥ 19,26 e VEGFA ≥ 76,38 N=7	P valor	FGF2 < 13,50 e VEGFA < 75,04 N=6	FGF2 ≥ 13,50 e VEGFA ≥ 75,04 N=7	P valor	FGF2 < 8,80 e VEGFA < 60,74 N=9	FGF2 ≥ 8,80 e VEGFA ≥ 60,74 N=9	P valor
TGF-β1 plasmático*	174,0 (112,6-393,9)	999,2 (309,0-2197)	**0,014**	282,0 (149,9-471,4)	1384 (183,6-2583)	0,295	410,0 (221,1-790,3)	697,9 (464,9-3882)	0,094
RNAm *TGFB1* (x 10^{-2})*	15,0 (6,4-28,3)	16,8 (7,0-35,5)	0,534	17,3 (11,4-24,9)	20,9 (14,3-28,9)	0,628	13,61 (6,692-34,13)	33,49 (14,67-43,47)	0,136
Idade*	57 (53-62)	67 (54-74)	0,252	72 (57-85)	54 (54-76)	0,317	66 (48-74)	66 (58-73)	0,757
Tempo de doença*	91,0 (56,0-109,8)	24,0 (2,0-60,0)	**0,022**	42,5 (12,8-82,3)	23,0 (6,0-65,0)	0,567	77,5 (30,0-135,0)	15,0 (0,0-67,8)	0,173

*As variáveis numéricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartílico (P25-P75). Para a comparação dos grupos com valores abaixo e maior ou igual à mediana das concentrações plasmáticas de FGF2 e VEGFA foi usado o teste de Mann Whitney. **As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses. Para a comparação dos grupos foi usado o teste *Likelihood Ratio*. Foram excluídos 8 pacientes do grupo MFP, 8 pacientes do grupo MFPTE e 6 pacientes do grupo TE, que tinham medianas de FGF2 e VEGFA discordantes.

5.10 Imunoexpressões de CD34, TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL nas biópsias de medula óssea dos pacientes com MFP, MFPTE e TE

Fotomicrografias das imunoexpressões de CD34, TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL estão exibidas nas **Figuras 13, 14, 15** e **16**, e as frequências dos escores das imunoexpressões de CD34, TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL de cada grupo de pacientes estão apresentadas na **Tabela 26**.

O grau de microvasculatura (angiogênese estimada) determinado pela imunoexpressão de CD34 nos cortes histológicos de biópsia de medula óssea não foi diferente entre os grupos de pacientes com MFP, MFPTE e TE. Além disso, não foram encontradas correlações entre a imunoexpressão de CD34 e as expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* de leucócitos de sangue periférico, nem a concentrações plasmáticas de TGF-β1, VEGFA e FGF2.

Não houve correlação (Spearman) entre a imunoexpressão de CD34 e as expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* medulares quando consideradas para essa análise as amostras de pacientes com MFP, MFPTE e TE. Devido ao pequeno número amostral, não foi possível comparar essas variáveis entre os grupos de pacientes.

As imunoexpressões de TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL foram semelhantes entre os grupos de pacientes com MFP, MFPTE e TE.

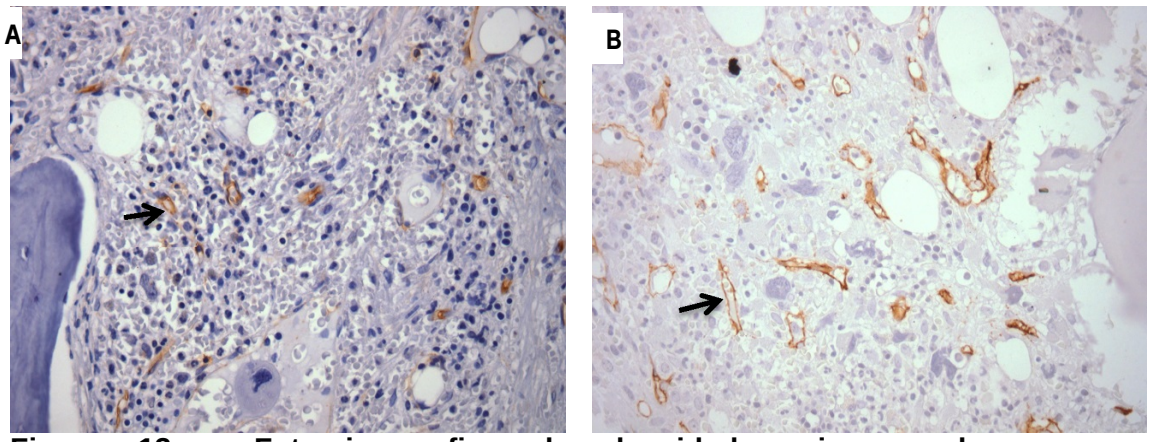

Figura 13 - Fotomicrografias da densidade microvascular para a imunoexpressão de CD34 (400x).
Marcações com grau 3 (A) e grau 4 (B).

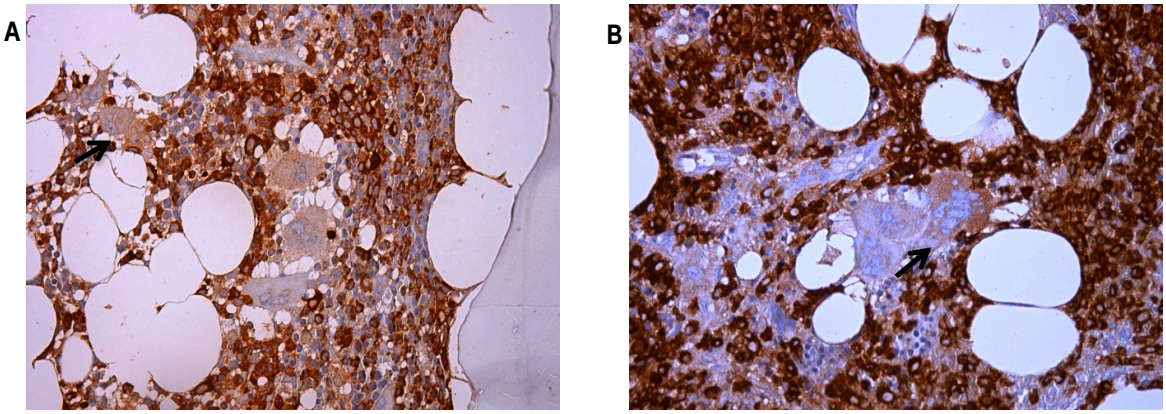

Figura 14 - Fotomicrografia da imunoexpressão de TGF-b1 ativo (400x).
(A) Fraco, (B) Moderado.

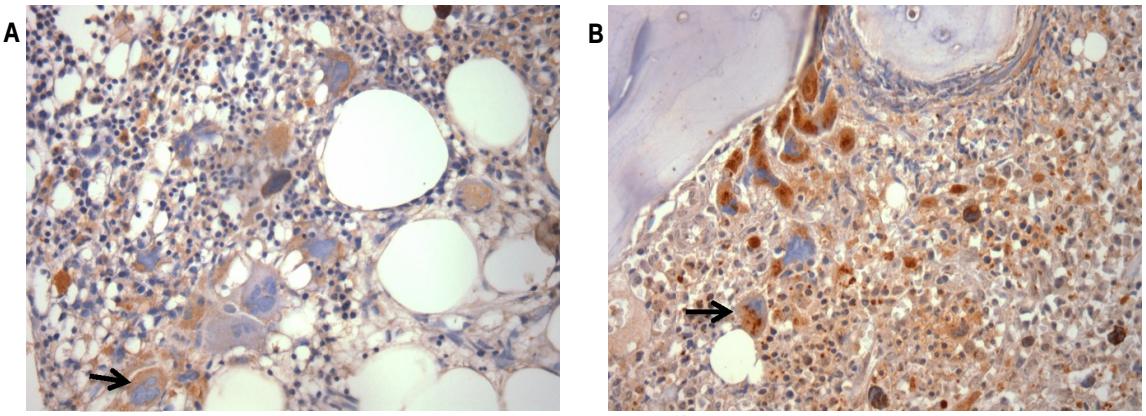

Figura 15 - Fotomicrografia da imunoexpressão de TGF-β1 latente (400x).
(A) Moderado, (B) Forte.

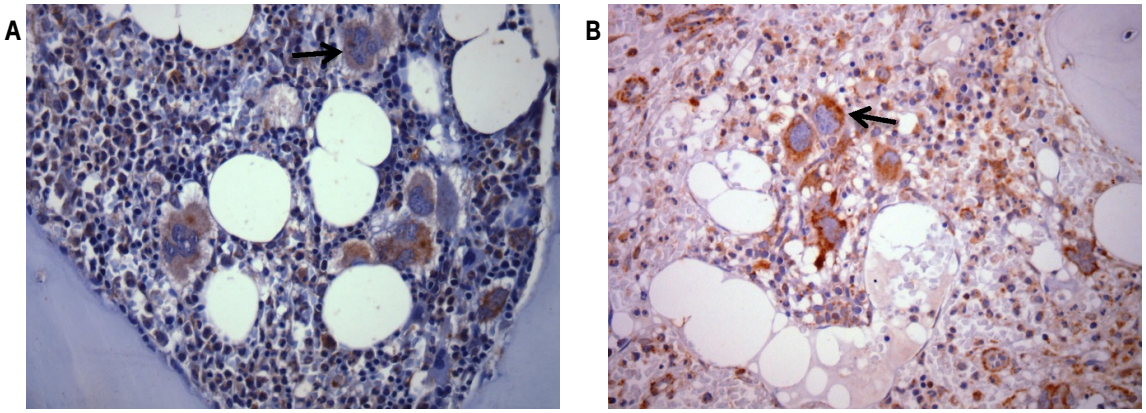

Figura 16 - Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Mpl (400x).
(A) Moderado, (B) Forte.

Tabela 26 - Frequências de imunoexpressões de CD34, TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente, c-MPL e em pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial

ESCORE	MFP (N=8)	MFPTE (N=8)	TE (N=10)*
CD34			
1	3 (37,5)	4 (50,0)	5 (50,0)
2	-	1 (12,5)	3 (30,0)
3	1 (12,5)	-	1 (10,0)
4	4 (50,0)	3 (37,5)	1 (10,0)
TGF-b1 ativo			
0	-	-	1 (10,0)
1	-	1 (12,5)	
2	2 (25,0)	-	4 (40,0)
3	5 (62,5)	4 (50,0)	2 (20,0)
6	-	1 (12,5)	-
9	1 (12,5)	2 (25,0)	3 (30,0)
TGF-β1 latente			
2	1 (12,5)	-	-
3	3 (37,5)	-	1 (11,1)
6	-	1 (12,5)	-
8	4 (50,0)	7 (87,5)	8 (88,9)
c-Mpl			
0	-	1 (12,5)	-
1	-	-	1 (10,0)
2	-	-	2 (20,0)
3	3 (37,5)	1 (12,5)	-
6	-	1 (12,5)	-
9	5 (62,5)	5 (62,5)	7 (70,0)

MFP: mielofibrose primária; MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial; TE: trombocitemia essencial. * Não foi possível realizar a análise de TGF-β1 latente em um paciente do grupo de TE. Os dados apresentados são número de indivíduos e porcentagem entre parênteses.

5.11 Associação da carga alélica da mutação *JAK2V617F* às expressões gênicas de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2*, às expressões de RNAm de *SMADs* e de microRNAs, e aos dados hematológicos dos pacientes com MFP, MFPTE e TE

Para avaliar se a carga alélica da mutação *JAK2V617F* está associada às concentrações plasmáticas e expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2*, às expressões de RNAm dos *SMADs*, às expressões dos microRNAs e aos dados hematológicos, os pacientes com MFP, MFPTE e TE positivos para a mutação *JAK2V617F* foram classificados em dois subgrupos de acordo com a mediana da carga alélica. Os dados dessas análises estão dispostos na **Tabela 27**. Menores concentrações plasmáticas de TGF-β1 foram observadas no subgrupo com carga alélica acima da mediana dos pacientes com MFP (p=0,052). As demais variáveis analisadas, inclusive os *SMADs*, não mostraram diferença de acordo com a mediana da carga alélica em nenhum dos grupos.

Tabela 27 - Concentrações plasmáticas e expressões de RNAm de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* e dados hematológicos dos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial positivos para a mutação *JAK2V617F* segundo a mediana da carga alélica

Variáveis	MFP			MFPTE			TE		
	<25,50 N=5	≥25,50 N=6	P valor	<9,91 N=6	≥9,91 N=6	P valor	<9,0 N=7	≥9,0 N=6	P valor
Concentrações plasmáticas									
TGF-β1 (pg/ mL)	999,2 (294,6- 1243,0)	216,5 (106,2- 534,0)	**0,052**	947,5 (228,1-2724,0)	763,6 (198,9-2240)	0,937	799,0 (281,1-4287,0)	722,0 (438,8-1050,0)	0,628
VEGFA (pg/ mL)	30,9 (2,0- 2105)	67,5 (46,9- 413,1)	0,662	177,4 (87,1-274,6)	107,0 (12,6-513,1)	0,818	69,6 (28,7-919,3)	81,9 (45,5-324,2)	0,945
FGF2 (pg/ mL)	10,4 (3,3- 877,5)	5,3 (2,2- 182,2)	0,537	27,8 (6,5-121,5)	17,1 (8,9-87,2)	0,873	13,8 (0,0-62,0)	7,6 (0,0-27,1)	0,717
Expressão RNAm									
***TGFB1* (x 10^{-2})**	16,8 (9,3- 34,9)	31,2 (8,3- 55,9)	0,537	21,9 (9,4-38,8)	16,5 (7,2-30,4)	0,699	14,8 (11,8-38,0)	36,9 (22,9-55,8)	0,181
***VEGFA* (x 10^{-4})**	37,3 (7,2-1416,0)	27,5 (16,8- 489,0)	0,931	25,9 (11,2-1,2)	5,3 (6,8-221,5)	0,589	15,7 (13,5-61,4)	54,4 (30,4-353,9)	0,073
***FGF2* (x 10^{-4})**	5,2 (1,9- 98,8)	25,63 (9,1-1034,0)	0,429	3,5 (1,5-12,9)	15,4 (1,8-28,0)	0,429	2,4 (0,4-4,4)	4,5 (2,5-6,8)	0,295
Dados hematológicos									
Hemácias (x10^6 /mm^3)	4,9 (3,0- 5,8)	4,5 (3,8- 5,4)	0,792	4,1 (3,3-5,2)	3,9 (3,5-5,5)	0,818	4,7 (3,4-5,1)	3,2 (2,9-4,7)	0,343
Hemoglobina (g/ dL)	15,9 (10,6-17,2)	14,2 (11,0-15,7)	0,360	13,8 (12,6-15,8)	12,6 (11,5-15,2)	0,422	14,7 (12,5-15,4)	12,1 (8,4-15,1)	0,290
Hematócrito (%)	45,5 (31,5-51,1)	41,5 (32,7-46,8)	0,537	41,1 (35,4-45,8)	36,9 (33,4-45,5)	0,810	42,3 (35,3-43,7)	36,6 (25,7-44,8)	0,268
VCM (fL)	87,2 (82,0-111,7)	85,0 (81,9-95,7)	0,537	103,6 (83,8-109,2)	88,4 (74,7-102,1)	0,240	91,4 (87,8-117,5)	89,8 (85,0-116,1)	0,755
HCM (pg)	29,8 (27,9-37,7)	28,8 (27,4-32,6)	0,429	35,6 (28,0-37,9)	32,0 (25,0-103,6)	0,589	30,8 (29,8-41,1)	29,1 (28,1-38,9)	0,432
CHCM (g/ dL)	33,8 (33,5-34,4)	34,0 (33,9-34,2)	0,782	34,4 (34,0-35,1)	33,8 (33,5-34,5)	0,376	33,6 (32,9-35,4)	33,1 (32,6-33,7)	0,167
RDW (%)	18,1 (13,7-20,4)	18,7 (17,3-21,1)	0,429	17,5 (13,1-19,3)	18,5 (16,7-22,0)	0,589	14,0 (13,1-14,7)	15,4 (12,8-25,5)	0,416
Leucócitos (x10^3 /mm^3)	6,0 (4,0-11,4)	11,9 (7,3-17,1)	0,143	7,6 (6,0-11,3)	11,4 (3,5-32,6)	0,589	7,2 (6,3-9,1)	9,9 (6,7-18,1)	0,202
Plaquetas (x10^3 /mm^3)	375 (205-774)	415 (65-641)	1,000	428 (295-681)	305 (142-640)	0,394	510 (334-635)	367 (313-775)	0,876

MFP: mielofibrose primária, MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial, TE: trombocitemia essencial. VCM: Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: *red cell distribution width* (variação de tamanho). As variáveis numéricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartílico (P25-P75). Para a comparação dos grupos com valores abaixo e maior ou igual à mediana da carga alélica foi usado o teste de Mann Whitney.

5.12 Frequências das mutações *W515K/L* no gene *MPL*

Para a detecção das mutações *MPL W515K* e *W515L*, foram selecionados os 31 pacientes negativos para a mutação *JAK2V617F*. Apenas um paciente com TE mostrou-se positivo para a mutação *W515L* (**Figura 17**). Trata-se de uma mulher de 72 anos, com 57 kg e 1,60 m de altura que não fazia uso de hidroxicarbamida e não apresentava esplenomegalia.

Nenhum dos pacientes avaliados apresentou a mutação *W515K* no gene *MPL*.

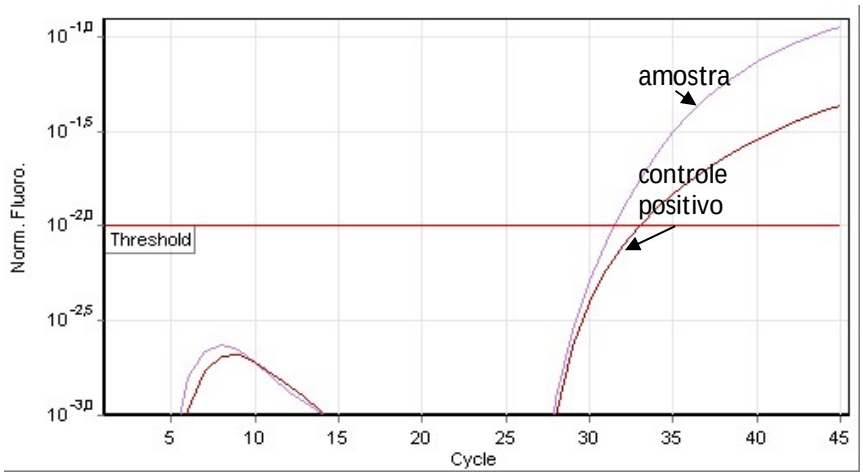

Figura 17 - Curvas da análise da amostra positiva para a mutação *W515L* no gene *MPL*.

5.13 Frequências de mutações no gene *CALR* nos pacientes negativos para as mutações *JAK2V617F* e *MPLW515K/L*

Dentre os pacientes negativos para as mutações *JAK2V617F* e *MPL W515K/L*, foram encontradas mutações no gene *CALR* em 80,0% daqueles com MFP, 77,8% daqueles com MFPTE e 27,3% daqueles com TE.

As mutações no gene *CALR* mais frequentemente encontradas nos pacientes foram a mutação tipo 1 (p.L367fs*46), seguida pela mutação tipo 2 (p.K385fs*47). Havia nove (32,1%) pacientes com mutação tipo 1 e seis pacientes (21,4%) com a mutação tipo 2, enquanto os demais exibiram os tipos 32 (p.K385fs*46) e 40

(p.K375fs*49), bem como uma mutação nova (*1125delA*). Os pacientes com TE não apresentaram mutação tipo 2. A distribuição das mutações *CALR* entre os grupos de pacientes foi apresentada na **Tabela 28**.

O paciente com MFP portador da nova mutação no gene *CALR* (*1125delA*) não apresentou diferenças nos dados hematológicos e clínicos em relação aos pacientes portadores das mutações tipo 1 ou tipo 2 (p>0,05). Esse homem de 61 anos de idade apresentava anemia grave (concentração de hemoglobina = 5,8 g/dL), contagem de leucócitos de 4.200/ mm^3, e contagem de plaquetas de 133.000/ mm^3. Ele não apresentava histórico de eventos trombóticos ou diabetes, mas era hipertenso. A respeito dessa nova mutação, a deleção *1125delA* leva a um *frameshift* responsável por alterações na estrutura secundária da proteína para uma conformação de alfa-hélice.

Tabela 28 - Distribuições das frequências das mutações no gene CALR nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e trombocitemia essencial

Mutação	Tipo da mutação	MFP (n=10)	MFPTE (n=9)	TE (n=9)	Total
1092_1143del52	1	4 (40,0)	3 (33,4)	2 (20,0)	9 (32,1)
1154_1155insTTGTG	2	3 (30,0)	3 (33,4)	0	6 (21,4)
1153_1154AA>TGTC	32	0	1 (11.1)	0	1 (3,6)
1122_1140del19	40	0	0	1 (10,0)	1 (3,6)
*1125delA**	não descrita	1 (10,0)	0	0	1 (3,6)
Tipo selvagem	nenhuma	2 (20,0)	2 (22,2)	6 (60,0)	10 (35,7)

**1125delA* é uma mutação nova. MFP: mielofibrose primária, MFPTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial, TE: trombocitemia essencial. As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos e frequência entre parênteses.

5.14 Comparações dos dados hematológicos e das expressões gênicas de *TGFB1*, *VEGFA* e *FGF2* nos pacientes com MFP, MFPTE e TE de acordo a presença das mutações *JAK2V617F* ou *CALR*

Na **Tabela 29** estão dispostas as características clínicas e hematológicas dos 64 pacientes selecionados para essa análise, classificados de acordo com a presença de mutações (*CALR* mutado, *JAK2V617F* mutado e triplo negativo), portanto, o paciente com mutação *MPL*W*515L* não foi incluído nessa tabela.

Os pacientes com mutação no gene *CALR* apresentaram maiores contagens de plaquetas (p=0,032) e menor frequência de esplenomegalia (p=0,030) do que os *JAK2V617F* mutados, enquanto os pacientes triplo negativos tiveram maior IMC do que os *JAK2V617F* mutados (p=0,011). Além disso, os pacientes triplo negativos também tiveram maiores concentrações de PCRus (p=0,011) do que os pacientes *CALR* mutados.

Os pacientes com MFP e mutações no gene *CALR* apresentaram menores contagem de eritrócitos (p=0,048), concentração de hemoglobina (p=0,021), hematócrito (p=0,021), concentração de PCRus (p=0,035) e frequência de esplenomegalia (p=0,031) do que os pacientes *JAK2V617F* positivos, e não apresentaram diferenças em relação às concentrações plasmáticas de VEGFA, FGF2 e TGF-β1. Além disso, pacientes com MFP triplo negativos mostraram maior frequência de eventos trombóticos (p=0,019) em relação aos *JAK2V617F* mutados, enquanto a concentração de PCRus (p=0,036) e a frequência de esplenomegalia (p=0,009) foram maiores nos pacientes triplo negativos em relação aos portadores de mutação no gene *CALR*. Pacientes com TE e mutações no gene *CALR* exibiram maiores contagens de plaquetas (p=0,043) e menores concentrações de TGF-β1 plasmático (p=0,026) em relação aos *JAK2V617F* mutados, e os pacientes com MFPTE e mutações no gene *CALR* apresentaram maior IMC (p=0,042) e menores concentrações plasmáticas de VEGFA (p=0,007) e FGF2 (p=0,024), e imunoexpressão de CD34 (p=0,022) do que os *JAK2V617F* mutados.

Tabela 29 - Características clínicas e hematológicas dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de mutações nos genes *CALR* e *JAK2*

Variáveis	Todos os pacientes (n=64)	*CALR* mutado (A) (n=18)	*JAK2V617F* mutado (B) (n=36)	Triplo negativo (C) (n=10)	P valor (A) X (B)	P valor (B) X (C)	P valor (A) X (C)
Idade (anos)	65 (54-74)	61 (56-73)	67 (54-76)	60 (39-75)	0,714*	0,280*	0,401*
Homens	27 (42,2)	7 (38,9)	18 (50,0)	2 (20,0)	0,440$^{£}$	0,150$^{€}$	0,417$^{€}$
Hemácias (x10^{6} /mm^{3})	4,0 (3,4-4,8)	4,1 (3,3-4,4)	4,1 (3,4-5,1)	3,8 (3,5-4,4)	0,353*	0,557*	0,924*
Hemoglobina (g/dL)	13,2 (11,8-15,0)	12,6 (11,3-14,0)	14,1 (12,2-15,7)	13,4 (11,4-14,9)	0,060*	0,682*	0,314*
Hematócrito (%)	38,8 (35,3-43,7)	36,5 (33,2-41,0)	41,7 (35,4-45,5)	39,4 (33,4-43,6)	0,079*	0,723*	0,250*
Leucócitos (x10^{6} /mm^{3})	7,5 (5,7-10,6)	7,1 (5,1-8,3)	8,1 (6,0-13,4)	8,8 (4,8-9,5)	0,098*	0,503*	0,325*
Plaquetas (x10^{6} /mm^{3})	462 (304-680)	634 (401-811)	385 (270-599)	396 (238-671)	**0,032***	0,902*	0,093*
IMC (kg/m^{2})	24,7 (22,5-27,3)	23,3 (20,6-29,0)	24,2 (22,5-26,0)	27,1 (24,8-31)	0,959*	**0,011***	0,084*
PCRus (mg/dL)	0,17 (0,07-0,34)	0,08 (0,04-0,24)	0,17 (0,09-0,32)	0,43 (0,17-0,77)	0,125*	0,064	**0,011***
Esplenomegalia	14 (21,9)	1 (5,6)	10 (27,8)	3 (30,0)	**0,030**$^{€}$	1,000$^{€}$	0,130$^{€}$
Perda de peso	7 (10,9)	1 (5,6)	5 (13,9)	1 (10,0)	0,651$^{€}$	1,000$^{€}$	1,000$^{€}$
Eventos trombóticos	6 (9,4)	1 (5,6)	4 (11,1)	1 (10,0)	0,651$^{€}$	1,000$^{€}$	1,000$^{€}$
Hipertensão	33 (51,6)	6 (33,3)	20 (55,6)	7 (70,0)	0,080$^{£}$	0,716$^{€}$	0,114$^{€}$

IMC: índice de massa corpórea. PCRus: Proteína C-reativa ultrassensível. As variáveis numéricas foram apresentadas como mediana (P25-P75); Os grupos foram comparados pelo teste Mann-Whitney (*) (AxB; BxC and AxC). As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos (porcentagem); o teste Qui Quadrado ($^{£}$) ou o teste exato de Fisher ($^{€}$) foi usado para comparar as frequências entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

A MF, a NMP cromossomo Ph negativo mais grave, é caracterizada por anemia, osteosclerose, angiogênese, expressão anormal de citocinas, fibrose na medula óssea e esplenomegalia progressiva decorrente da hematopoiese extramedular (Barosi e Hoffman, 2005; Hoffman e Rondelli, 2007; Tefferi e Vardiman, 2008b). O aumento progressivo do baço provoca desconforto abdominal, enquanto saciedade precoce e diarréia, causados por infartos esplênicos, são frequentemente associados a caquexia profunda, fadiga e agravamento de citopenias pré-existentes (Cervantes, 2011).

A perda de peso é uma característica bem descrita das NMPs em geral, e aproximadamente 13% dos pacientes apresentam emagrecimento involuntário durante o curso da doença. Corroborando com dados da literatura, 14,3% dos pacientes com MFP, 4,8% dos com MFPTE e 12,5% daqueles com TE apresentaram perda de peso (Mesa, Niblack*, et al.*, 2007); além de que, os pacientes com MFP e MFPTE apresentaram menor IMC do que seus respectivos controles.

O maior número de plaquetas nos pacientes com TE do que em seus controles provavelmente foi causado devido à hiperplasia da medula óssea, proliferação excessiva de megacariócitos e, principalmente, plaquetose acentuada, características dessa doença (Fialkow *et al.*, 1981).

A maior causa de mortalidade associada à TE é a trombose nas grandes artérias, que pode ocasionar danos neurológicos e cardíacos graves, levando à perda das habilidades motoras. Como a maioria dos pacientes encontrava-se em tratamento, era esperado que o risco de desenvolvimento de trombose fosse reduzido ou próximo ao de indivíduos que não apresentam a doença. Apesar dos pacientes com TE não terem apresentado maior frequência de eventos trombóticos do que seus controles, foi observada maior frequência de hipertensão arterial nesses pacientes. Essa condição é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de trombose, que pode estar relacionada à predisposição a eventos vasculares oclusivos envolvendo a circulação arterial periférica (Brière, 2007).

Diversos fatores podem estar relacionados à ausência de diferença na expressão gênica do TGF-β1 entre pacientes e controles neste estudo. A mediana de tempo de doença dos pacientes indica que a maioria deles apresentava a doença há alguns anos, e devido à gravidade dessa, os pacientes não devem ser mantidos sem tratamento.

A hidroxicarbamida é um potente inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, inibidora da replicação do DNA em uma grande variedade de células, privando a DNA polimerase do dNTP na forquilha de replicação (Koç *et al.*, 2004). Como a maior parte do TGF-β1 é proveniente de megacariócitos (Sporn e Roberts, 1992; Dong e Blobe, 2006), a redução da hiperplasia dessas células, dentre outras, devido à terapia antineoplásica poderia ser responsável pela normalização da expressão do *TGF-β1* nesses pacientes. Por outro lado, as expressões gênicas de *VEGFA* e *FGF2* se manteriam aumentadas, visto que esses são produzidos por diversos tipos celulares, sendo o VEGFA sintetizado principalmente por células endoteliais, macrófagos, células T ativadas, (Zittermann e Issekutz, 2006), e o FGF2 por células estromais e hematopoiéticas (Martyré *et al.*, 1997).

Corroborando com essa hipótese, os pacientes com MFP e maior angiogênese, segundo as medianas das concentrações plasmáticas de VEGFA e FGF2 concomitantemente, apresentaram maiores concentrações plasmáticas de TGF-β1 e menor tempo de doença. O mesmo ocorreu para os pacientes com MFPTE e TE, embora nesses grupos esses dados não tenham sido estatisticamente significativos. A concentração reduzida de TGF-β1 nos pacientes com doença há mais tempo poderia estar relacionada ao uso da hidroxicarbamida. O TGF-β1 está envolvido em diversos processos patológicos, tais como nas doenças cardiovasculares (Dabek *et al.*, 2006; Lim e Zhu, 2006) e na nefropatia diabética (Goldfarb e Ziyadeh, 2001). Apesar da seleção rigorosa dos controles para esse estudo, houve grande dificuldade em incluir somente indivíduos sem hipertensão e diabetes, devido à idade avançada dos pacientes com os quais foram pareados. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas nas frequências da presença de diabetes e de hipertensão entre os pacientes e controles, apesar dos pacientes com TE terem apresentado maior frequência de hipertensão, essas variáveis poderiam ter interferido no resultado final das análises. De qualquer maneira, a idade avançada dos pacientes e controles é frequentemente associada a doenças

inflamatórias e infecciosas, que podem causar aumento da expressão gênica de *TGF-β1*, contribuindo para a ausência de associação entre o TGF-β1 e as NMPs estudadas. As maiores concentrações plasmáticas de VEGFA encontradas nos pacientes em relação aos seus controles destacam o papel dessa proteína nas NMPs. O VEGFA controla diversas funções das células endoteliais envolvidas na angiogênese e as protege da apoptose (Hicklin e Ellis, 2005). A importância funcional do VEGFA para o desenvolvimento do câncer foi demonstrada em diversos estudos (Ferrara, 2002), e as concentrações elevadas dessa proteína no plasma dos pacientes corroboram com o aumento da angiogênese nas NMPs (Bertolini *et al.*, 2000; Mangi e Newland, 2000).A maior expressão gênica de *FGF2* nos pacientes era esperada, visto que essa citocina apresenta importante papel na fisiopatologia da MF e da TE, e o aumento de suas concentrações em plaquetas e megacariócitos circulantes de 20 pacientes com MF fora previamente demonstrado (Martyré *et al.*, 1997). Adicionalmente, foi observado aumento da expressão gênica de *FGF2*, bem como de receptores dessa via de sinalização em células CD34+ de pacientes com MF. É possível que as expressões aumentadas de FGF2 e de seus receptores tipo I e tipo II tenham efeito no aumento da proliferação dos progenitores CD34+ nesses pacientes (Le Bousse-Kerdilès e Martyré, 2001). A constatação de que há maior expressão gênica de *TGF-β1* nos pacientes com maiores concentrações dos marcadores plasmáticos de angiogênese VEGFA e FGF2 reafirma o papel do *TGFB1* no processo de angiogênese, embora esses dados não tenham sido significativos em todos os grupos. Lev e colaboradores (2007) demonstraram que as concentrações plasmáticas de TGF-β1 e FGF2 são maiores em pacientes com TE, embora as concentrações intraplaquetárias de TGF-β1 sejam normais e as de FGF2 aumentadas em relação aos controles. Complementarmente, as imunoexpressões de TGF-β1 e FGF2 em megacariócitos e linfócitos de pacientes com TE apresentam padrões similares de intensidade de marcação, sugerindo que outras células possam contribuir para as concentrações aumentadas dessas citocinas no plasma. Aparentemente, as concentrações plasmáticas de TGF-β1 estão mais associadas ao VEGFA do que ao FGF2. Parte da natureza complexa das interações entre esses os fatores angiogênicos foi demonstrada pelas correlações entre as concentrações plasmáticas de TGF-β1 e de VEGFA em todos os grupos de pacientes

e controles estudados, enquanto as concentrações plasmáticas de TGF-β1 somente se correlacionaram às de FGF2 no grupo de pacientes com MFP e em seus controles, e nos controles de pacientes com MFPTE. Ao mesmo tempo, nos modelos de regressões lineares, as concentrações plasmáticas de VEGFA foram associadas às variações nos valores de log10 de TGF-β1 plasmático em todos os grupos de pacientes, exceto no grupo de MFP.

Parte do efeito estimulante do TGF-β1 na angiogênese *in vivo* pode ocorrer de maneira indireta, pelo recrutamento de células inflamatórias que secundariamente liberam fatores angiogênicos, como VEGFA e FGF2 (Li, Zhang e Kirsner, 2003) (Brogi *et al.*, 1994). Como o TGF-β1 induz a expressão do VEGF nas células endoteliais (Seghezzi *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 2006), ambos são frequentemente co-expressos em tecidos nos quais ocorre a angiogênese (Pardali e Moustakas, 2007). Além disso, a expressão de VEGFA pode ser regulada positivamente por FGF2 (Brogi *et al.*, 1994; Tsai, Goldman e Gillespie, 1995), e possivelmente ocorre *cross-talk* entre os membros dessas famílias na angiogênese (Presta *et al.*, 2005). Interessantemente, a correlação positiva entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e *VEGFA* e entre *TGFB1* e *FGF2* nos controles de todos os grupos, o que não ocorreu nos pacientes, permite supor que a interação entre a expressão de RNAm de *TGFB1* e VEGFA e entre *TGFB1* e *FGF2* nas NMPs pode ser diferente da que ocorre em indivíduos sem essas doenças.

Os *SMADs* são os transdutores da sinalização via TGF-β1 mais bem caraterizados, e têm um papel crítico na maioria das ações do TGF-β1 (Massagué, 2000). A identificação dessas proteínas levou à elucidação da via de sinalização canônica do TGF-β1 (Hoover e Kubalak, 2008), e há crescentes evidências de que alterações nos componentes dessa via modificam o risco de câncer (Kaminska, Wesolowska e Danilkiewicz, 2005; Massagué, Seoane e Wotton, 2005).Nos pacientes com MFPTE e TE e nos seus respectivos controles não houve correlação entre a concentração plasmática de TGF-β1 e a expressão de RNAm de nenhum dos *SMADs*, possivelmente porque o TGF-β1 pode sinalizar por outras vias. Apesar da sinalização pelos *SMADs* ser a principal via do TGF-β1, a sinalização do TGF-β1 pode ser ocorrer independentemente da via dos *SMADs*, enviando sinais por meio da via MAPK (Massagué, 2000), e ativando Erk, JNK (quinase c-Jun N-terminal) e via p38-MAPK de maneira independente de transcrição mediada por *SMADs*

(Derynck e Zhang, 2003). Para estimular a expressão gênica de *VEGFA* em células mesangiais de murinos, por exemplo, o TGF-β1 sinaliza pelas vias MKK3 (Proteína quinase quinase ativada por mitógeno 3)-p38α e p38δ-MAPK (Wang *et al.*, 2004).

Interessantemente, foi encontrada correlação entre a concentração plasmática de TGF-β1 e a expressão de RNAm de *SMAD2* nos pacientes com MFP e em seus controles, enquanto a correlação com RNAm de *SMAD3* deu-se apenas nos pacientes com MFP. Esse achado pode estar associado ao fato de que o TGF-β1 estimula a liberação de VEGFA por fibroblastos por meio de Smad3, sendo esse um fator pró-angiogênico (Nakagawa *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005). A hipóxia e a sinalização do TGF-β1 podem sinergicamente regular a expressão gênica de *VEGFA* a nível transcricional, e cooperar na indução da atividade do promotor de VEGFA. Essa cooperação foi mapeada no promotor do VEGFA em uma região que contém sequências de ligação a DNA funcionais para HIF-1 e *SMADs* (Sánchez-Elsner *et al.*, 2001).

Uma importante habilidade do TGF-β1 é a de ativar a expressão de seu RNAm e, portanto, sua própria secreção (Van Obberghen-Schilling *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1990; Jachimczak *et al.*, 1996), embora o aumento da concentração da proteína nem sempre se correlacione ao aumento da expressão de RNAm de *TGFB1* (Kim *et al.*, 1992). De fato, em nenhum dos grupos de pacientes e controles estudados foi encontrada correlação entre a expressão de RNAm de *TGFB1* e a concentração plasmática de TGF-β1.

Como a expressão gênica de *TGF-β1* foi semelhante entre pacientes e controles, a ausência de diferenças nas expressões de RNAm dos *SMADs* também era esperada. No entanto, foi possível observar que os controles de todos os grupos apresentaram correlações diretas entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e dos *SMADs 1* a *7*, enquanto os pacientes apresentaram diferentes perfis dessas correlações.

As correlações encontradas entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e de *SMADs 1* a *7* no grupo de pacientes com MFP foram semelhantes às observadas nos seus controles, e apenas o *SMAD6* não se correlacionou a expressão de RNAm de *TGFB1*. O Smad6 inibe preferencialmente a via das BMP, que apresenta atividade antifibrinogênica e de redução da deposição de colágeno, além de formar complexo com Smad1 e competir com Smad4 para formação de oligômero (Miyamoto *et al.*,

2010; Miyazono, Kamiya e Morikawa, 2010). Essa ausência de correlação entre o RNAm de *TGFB1* e *SMAD6* poderia indicar que o *SMAD6* não atua diretamente na inibição do RNAm de *TGFB1* nesses pacientes, diferentemente do que ocorre nos controles.

A maioria das respostas do TGF-β1 é mediada por Smad3 e Smad4, e algumas requerem a ativação concomitante de Smad2 e Smad3 juntamente com Smad4 (Feng, Lin e Derynck, 2000; Derynck e Zhang, 2003). Portanto, a ausência de correlações entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e de *SMADs* 2, 3, 4 e 5 nos pacientes com MFPTE, opostamente ao observado nos seus controles, poderia indicar que a expressão do *TGFB1* não seja induzida pela via do TGF-β1 nesses pacientes.

Mutações que resultam na inativação da via de sinalização do TGF-β1 são raras em leucemias e outras neoplasias hematológicas. No entanto, alterações na sinalização do TGF-β1 nessas doenças podem ser causadas por supressão de respostas de transcrição dependente de Smad por oncoproteínas Evi-1, AML1/ETO e Tax. A perda de resposta ao TGF-β1 nas neoplasias hematológicas é comumente causada pela alteração da expressão de coativadores e correpressores da sinalização de *SMADs* ou devido a mutações em genes alvo do TGF-β1 (Pietenpol *et al.*, 1990; Kurokawa *et al.*, 1998; Jakubowiak *et al.*, 2000).

As BMPs são fatores de crescimento multifuncionais que pertencem à superfamília do TGF-β, e a sinalização por essa via é mediada pelos *SMADs* 1, 5 e 8. A fosforilação dos receptores da via de sinalização das BMPs leva à subsequente fosforilação de Smad1, Smad5, ou Smad8, permitindo que esses formem complexo com Smad4. Esse complexo heterométrico transloca para o núcleo, objetivando genes regulados pelas BMPs, atráves de interações com co-ativadores ou repressores (Villapol, Logan e Symes, 2013). Nos pacientes com MFPTE, a expressão de RNAm de *TGFB1* foi correlacionada à expressão de *SMAD1*, mas não à de *SMAD5*. É possível que o *TGFB1* seja estimulado pela via das BMPs, por meio da transdução de sinal pelo *SMAD1*, mas não pelo *SMAD5*.

Nos pacientes com TE, por outro lado, não foram encontradas correlações entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e *SMADs 1*, *2*, *3*, *5* e *6*. Aparentemente a expressão do RNAm de *TGFB1* não é induzida por *SMADs*, nem pela via do TGF-β1, nem pela via das BMPs nos pacientes com TE.

Diversos estudos, realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, indicam que os miRNAs são importantes reguladores da hematopoiese e possuem papel na patogênese de algumas doenças hematológicas, atuando como supressores tumorais ou como oncogenes (Lawrie, 2007).

Foi demonstrado que o miR-28 regula negativamente a expressão de MPL numa fração de plaquetas de pacientes com NMPs (Girardot *et al.*, 2010). O perfil de expressão de miRNAs em megacariócitos de MFP revelou que, na fase pré-fibrótica, a proliferação autônoma da linhagem megacariocítica é associada ao acúmulo significativo de miR-146b em comparação à megacariopoese normal. Diferenças complexas na expressão de miRNAs especificamente relacionados à doença parecem ser a alteração básica associada à progressão da MFP (Hussein *et al.*, 2009).

Dentre os miRNAs avaliados nesse estudo, o miR-193a-5p e o miR-542-5p apresentam função de supressores tumorais em diferentes tipos de câncer. O mir-193a-5p possui como alvos as vias de sinalização TGF-β, Wnt e MAPK (Gougelet *et al.*, 2011), e sua expressão foi identificada em fibroblastos embrionários e adultos (Houbaviy, Murray e Sharp, 2003; Koh *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que o miR-193a-5p atua como supressor tumoral reprimindo a expressão de c-kit, um proto-oncogene, na LMA (Gao *et al.*, 2011), ou regulando negativamente ERBB4, um receptor tirosinoquinase, em câncer de pulmão (Liang *et al.*, 2015). O miR-542-5p, por sua vez, suprime a proliferação de células pulmonares cancerosas (Yamaguchi *et al.*, 2012), e sua baixa expressão é associada à redução da sobrevida de pacientes com neuroblastoma, indicando potencial função de supressor de tumor (Bray *et al.*, 2011).O miR-590-3p e o miR-590-5p, por outro lado, foram reconhecidos como oncogenes. O miR-590-5p está altamente expresso em câncer cervical humano, e foi relacionado à promoção do crescimento e invasão tumoral (Chu *et al.*, 2014). Esse miRNA também é superexpresso em carcinoma de células renais, e atua na regulação negativa de PBRM1, um supressor tumoral, levando ao aumento da proliferação e ao comportamento agressivo do tumor (Xiao *et al.*, 2013). Juntamente com o miR-590-3p, o miR-590-5p está excessivamente expresso em carcinoma hepatocelular (Yang *et al.*, 2013).O papel do miR-369-5p em cânceres humanos ainda não está claro. É conhecido, entretanto, que esse miRNA reduz significativamente a diferenciação de

adipócitos (Bock *et al.*, 2005), além de se associar diretamente a elementos ricos em adenina e uracila, os quais se ligam a proteínas específicas para ativar a transcrição (Vasudevan, Tong e Steitz, 2007).

Dado o importante papel do TGF-β1 na patogênese das NMPs, um dos objetivos do presente estudo foi investigar se a expressão de alguns dos miRNAs que possuem o *TGFB1* como alvo era diferente entre pacientes e controles. Como a expressão gênica de *TGF-β1* foi semelhante entre pacientes e controles, confirmou-se a ausência de diferenças nas expressões dos miRNAs avaliados.

No entanto, as correlações entre a concentração plasmática de TGF-β1 ou a expressão de RNAm de *TGFB1* e a expressão de miRNAs foram distintas entre pacientes e controles. Esses dados demonstram a possiblidade dos miRNAs regularem diferencialmente a expressão gênica de *TGF-β1* em pacientes e controles, sem necessariamente haver o aumento de sua expressão.

As correlações positivas encontradas entre a concentração plasmática de TGF-β1 ou a expressão de RNAm e os miRNAs estudados poderiam indicar que esses miRNAs não atuam diretamente sobre a expressão gênica de *TGF-β1* nos determinados grupos de pacientes ou controles. Outra hipótese é que a regulação da expressão do RNAm por esses miRNAs ocorreria por meio da inibição da tradução do *TGFB1*, e a ligação do miRNA ao RNAm para evitar a tradução faria com que ambos fossem encontrados em proporções semelhantes.

As correlações negativas entre essas variáveis, por outro lado, poderiam indicar a atuação direta do miRNA sobre a expressão gênica de *TGF-β1*, ou que a regulação do RNAm pelos miRNAs esteja ocorrendo por meio da degradação do RNAm, de modo que o aumento da expressão do miRNA levaria a menor expressão do RNAm.

Alguns estudos associaram a expressão de VEGF e de seus receptores na medula óssea com a densidade microvascular, inferindo importante papel dessa proteína na fisiopatologia das NMPs (Panteli *et al.*, 2004; Gianelli *et al.*, 2007; Alonci *et al.*, 2008; Boiocchi *et al.*, 2011). Não foi possível observar diferenças nas imunoexpressões de TGF-b1 ativo e TGF-β1 latente, c-MPL e CD34 entre os grupos de pacientes desse estudo, embora Panteli *et al.* (2004) tenha demonstrado que a angiogênese é mais intensa em pacientes com MF do que na TE. Além disso, foi demonstrada correlação entre TGF-β1 latente e a expressão de CD34 na medula

óssea de pacientes com MFP e TE, enquanto o TGF-β1 latente apresenta tendência a ser mais expresso em ambos os grupos, embora seja diferencialmente expresso em relação aos controles somente no estágio pré-fibrótico da MFP (Ponce *et al.*, 2014). Essas diferenças podem não ter sido encontradas devido ao número limitado de medulas incluídas em cada grupo desse estudo, portanto, não se pode descartar o papel dessas proteínas nas NMPs.

A mutação *JAK2V617F* foi o primeiro biomarcador identificado nas NMPs. As frequências da presença da mutação *JAK2V617F* observadas nesse estudo (52,4% na MFP, 57,1% na MFPTE e 54,2% na TE) são semelhantes às descritas em populações brasileiras (Monte-Mór *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2013).

A carga alélica da mutação *JAK2V617F* é uma medida variável, determinada pela frequência dos eventos de recombinação mitótica e da expansão de clones *JAK2V617F*. A variabilidade da carga alélica é em parte responsável pelos fenótipos clínicos distintos vistos nas NMPs (Stein *et al.*, 2010). Pacientes com TE apresentam os menores valores de carga alélica e aqueles com PV e MFP apresentam valores intermediários (Moliterno *et al.*, 2006; Passamonti *et al.*, 2006; Antonioli *et al.*, 2008), o que também foi demonstrado no presente estudo. Apesar dessas associações serem consistentemente observadas na prática clínica, a carga alélica não é um parâmetro prognóstico considerado para intervenções terapêuticas (Passamonti e Rumi, 2009).

A hematopoiese é um processo complexamente regulado por interações celulares e sinais reguladores. O FGF2 é um dos responsáveis pelo aumento da produção mielóide e atua como mitógeno para as células estromais da medula óssea. Um dos mecanismos pelos quais o FGF2 estimula a mielopoese é modulando a resposta inibitória do *TGFB1*, por meio da regulação negativa do número de receptores de *TGFB1* nas células endoteliais (Gabrilove *et al.*, 1994), visto que o *TGFB1* pode ter um importante papel na supressão da ativação e do crescimento de células progenitoras (Eaves *et al.*, 1991).

Baixos valores de carga alélica da mutação *JAK2V617F* ao diagnóstico foram associados à mielodepleção e menor sobrevida em pacientes com MFP (Guglielmelli *et al.*, 2009). Desse modo, concentrações elevadas de FGF2 associadas a maior carga alélica de *JAK2V617F* poderiam estar relacionadas a um fenótipo

mieloproliferativo, enquanto as concentrações elevadas de *TGFB1* em pacientes com baixa carga alélica podem estar associadas a um fenótipo mielodepletivo.

A alta carga alélica da paciente MFTE44 com alteração cariotípica, portadora de MFP, pode estar associada a um fenótipo mieloproliferativo, responsável pelo aumento do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito, além da leucocitose acentuada e plaquetose discreta. Entretanto, o outro paciente com cariótipo alterado, MFTE09, portador de MFPTE, não apresentou fenótipo mieloproliferativo, porém seus tempos de doença e de uso de hidroxicarbamida eram muito maiores do que da paciente MFTE44, o que poderia mascarar a ocorrência de tais achados.

A recente descoberta das mutações no gene *CALR* deu um novo horizonte para o diagnóstico e tratamento das NMPs (Guglielmelli *et al.*, 2014; Tefferi e Pardanani, 2014), e a identificação dessas mutações pode ter implicações para novas estratificações de risco, conduta e prognóstico (Andrikovics *et al.*, 2014; Rotunno *et al.*, 2014; Rumi *et al.*, 2014; Tefferi, Lasho, Finke, Belachew*, et al.*, 2014; Tefferi, Wassie, Guglielmelli*, et al.*, 2014).

As frequências das mutações *CALR* nos pacientes com NMPs desse estudo (27,3%) confirmam achados anteriores em pacientes europeus (20-25%) (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2014). Essas mutações estavam presentes em 74% (Tefferi, Lasho, Finke, Knudson*, et al.*, 2014) e 88% (Klampfl *et al.*, 2013) dos pacientes com MFP *JAK2V617F* negativos, enquanto no presente estudo a frequência encontrada foi de 80%. Por outro lado, estudos com pacientes chineses (Qiao *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014) e japoneses (Shirane *et al.*, 2015) mostraram menores frequências de mutações *CALR*. Interessantemente, as frequências de mutações *CALR* em pacientes com TE *JAK2V617F* negativos foram similares às reportadas em um estudo chinês (Wu *et al.*, 2014), mas muito menores do que as frequências descritas em outras populações (Klampfl *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2014; Rumi *et al.*, 2014; Shirane *et al.*, 2015). É possível que diferentes metodologias empregadas sejam responsáveis pelas discrepâncias encontradas nas frequências das mutações *CALR* dentre os pacientes com NMPs. Além disso, diferenças étnicas e ambientais poderiam estar associadas à diversificação das frequências das mutações *CALR* nas diferentes populações.

Pacientes portadores de mutação *CALR* apresentaram maiores contagens de plaquetas do que os *JAK2V617F*. No entanto, quando cada grupo de doença foi analisado separadamente, somente os pacientes com TE mantiveram essa característica. De fato, estudos anteriores mostraram que pacientes MFP e TE com mutações *CALR* apresentam maiores contagens de plaquetas do que os *JAK2V617F* (Rotunno *et al.*, 2014; Rumi *et al.*, 2014; Tefferi, Lasho, Finke, Belachew*, et al.*, 2014). Além disso, portadores de mutações *CALR* possuem menor idade e menor contagem de leucócitos do que os *JAK2V617F*. Embora não estatisticamente significativos, os dados desse estudo demonstram tendência de acordo com essas afirmações.

Dados do presente estudo mostraram menor frequência de esplenomegalia em pacientes com TE portadores de mutação *CALR* em comparação com *JAK2V617F*, assim como demonstrado previamente (Rumi *et al.*, 2014). Mutações *CALR* também foram associadas a menores contagem de hemácias, concentrações de hemoglobina e hematócrito em pacientes com MFP, como previamente reportado (Rotunno *et al.*, 2014; Tefferi, Lasho, Finke, Belachew*, et al.*, 2014; Shirane *et al.*, 2015).

Os pacientes portadores de mutações no gene *CALR* tem demonstrado maior sobrevida e melhor prognóstico em comparação aos *JAK2V617F* e triplo negativos (Tefferi, Lasho, Finke, Knudson*, et al.*, 2014). Como os pacientes com TE portadores da mutação *JAK2V617F* apresentaram maiores concentrações de TGF-β1 plasmático e os pacientes com MFPTE portadores da mutação *JAK2V617F* exibiram maiores concentrações plasmáticas de VEGFA e FGF2 do que aqueles com mutação *CALR*, é possível que a angiogênese contribua para essas diferenças no prognóstico e na sobrevida.

7 CONCLUSÕES

As concentrações plasmáticas elevadas de FGF2 e VEGFA são marcadores da MFP, MFPTE e TE. No entanto, as concentrações plasmáticas de TGF-β1 são semelhantes entre os pacientes e controles. Contudo, foi possível confirmar a correlação moderada e positiva entre o TGF-B1, um fator angiogênico indireto, e os dois outros marcadores de angiogênese (FGF2 e VEGFA).

A maior expressão de RNAm do *FGF2* é outro marcador da MFP, MFPTE e TE, não havendo diferença na expressão do RNAm de *TGFB1* e *VEGFA* entre pacientes e controles, assim como nos *SMADs*. No entanto, a interação entre a expressão de RNAm de *TGFB1* e *VEGFA* e entre *TGFB1* e *FGF2* nas NMPs parece ser diferente da que ocorre em indivíduos sem essas doenças.

Os pacientes com MFP com maiores concentrações dos marcadores plasmáticos de angiogênese, mas não aqueles com MFPTE e TE, apresentam maiores concentrações plasmáticas de TGF-β1 e menor tempo de doença em relação àqueles com menor angiogênese.

Nos controles de todos os grupos houve correlações diretas entre as expressões de RNAm de *TGFB1* e dos *SMADs 1* a *7*, enquanto nos pacientes foram encontrados diferentes perfis dessas correlações. O *SMAD6* parece não atuar diretamente na inibição do RNAm de *TGFB1* nos pacientes com MFP. A expressão do *TGFB1* pode não ser induzida pela via do TGF-β1 nos pacientes com MFPTE, enquanto nem a via do TGF-β1 nem das BMPs induzem a expressão de RNAm de *TGFB1* nos pacientes com TE.

As expressões de miR-193a-5p, miR-369-5p, miR-542-5p, miR-590-3p e miR-590-5p são semelhantes entre os pacientes com NMPs e seus controles. No entanto, as correlações entre a concentração plasmática de TGF-β1 ou a expressão de RNAm de *TGFB1* e a expressão de miRNAs são distintas entre pacientes e controles. É possível que os miRNAs regulem diferencialmente a expressão gênica de *TGF-β1* em pacientes e controles, sem necessariamente haver o aumento de sua expressão.

As correlações positivas encontradas entre a concentração plasmática de TGF-β1 ou a expressão de RNAm e os miRNAs estudados poderiam indicar que

esses miRNAs não atuam diretamente sobre a expressão gênica de TGF-β1 nos determinados grupos de pacientes ou controles. Outra hipótese é que a regulação da expressão do RNAm por esses miRNAs ocorreria por meio da inibição da tradução do *TGFB1*, e a ligação do miRNA ao RNAm para evitar a tradução faria com que ambos fossem encontrados em proporções semelhantes.

As correlações negativas entre essas variáveis, por outro lado, poderiam indicar a atuação direta do miRNA sobre a expressão gênica de *TGF-β1*, ou que a regulação do RNAm pelos miRNAs esteja ocorrendo por meio da degradação do RNAm, de modo que o aumento da expressão do miRNA levaria a menor expressão do RNAm.

Apesar das expressões de RNAm de *SMADs* e de microRNAs não serem diferentes entre pacientes com MFP, MFPTE e TE, é possível que os mecanismos de ação sobre a expressão gênica do *TGF-β1* sejam diferentes entre pacientes e controles.

A angiogênese estimada (CD34) não foi diferente entre os grupos de pacientes com MFP, MFPTE e TE, porém essas diferenças podem não ter sido encontradas devido ao número limitado de biópsias de medula incluídas em cada grupo de pacientes. Além disso, as imunoexpressões de TGF-b1 ativo, TGF-β1 latente e c-MPL foram semelhantes entre os grupos de pacientes estudados.

As frequências das mutações avaliadas foram similares às descritas na literatura. Os pacientes com MFPTE portadores de mutação *CALR* apresentaram menores concentrações plasmáticas de VEGFA e FGF2 do que os *JAK2V617F* positivos, enquanto os pacientes com TE portadores de mutação *CALR* exibiram menores concentrações plasmáticas de TGF-β1 do que os portadores de *JAK2V617F*.

Em suma, o presente trabalho permitiu confirmar a correlação positiva entre o TGF-β1 com os marcadores plasmáticos de angiogênese VEGFA e FGF2. As expressões de *SMADs* e de miRNAs estudados foram semelhantes entre pacientes e controles, visto não haver diferenças na expressão gênica de *TGF-β1*. Entretanto, disparidades encontradas nas correlações entre a expressão gênica de *TGF-β1* e diferentes *SMADs* e miRNAs nos pacientes e controles poderiam indicar que a regulação da expressão gênica de *TGF-β1* nas NMPs estudadas seja distinta da apresentada nos indivíduos sem essas doenças.

Abdel-Wahab, O. et al. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. **Leukemia,** v. 24, n. 9, p. 1656-7, 2010.

Adams, R. H.; Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 8, n. 6, p. 464-78, 2007.

Akhurst, R. J. The paradoxical TGF-β vasculopathies. **Nat Genet,** v. 44, n. 8, p. 838-9, 2012.

Alonci, A. et al. Evaluation of circulating endothelial cells, VEGF and VEGFR2 serum levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. **Hematol Oncol,** v. 26, n. 4, p. 235-9, 2008.

Alvarez-Larrán, A. et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. **Blood,** v. 116, n. 8, p. 1205-10, 2010.

Ambros, V. The evolution of our thinking about microRNAs. **Nat Med,** v. 14, n. 10, p. 1036-40, 2008.

Andersen, C. L.; Jensen, J. L.; Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res,** v. 64, n. 15, p. 5245-50, 2004.

Andrikovics, H. et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. **Haematologica,** v. 99, n. 7, p. 1184-90, 2014.

Annes, J. P.; Munger, J. S.; Rifkin, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. **J Cell Sci,** v. 116, n. Pt 2, p. 217-24, 2003.

Antonioli, E. et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. **Haematologica,** v. 93, n. 1, p. 41-8, 2008.

Arora, B.; Mesa, R.; Tefferi, A. Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Leuk Lymphoma,** v. 45, n. 12, p. 2373-86, 2004.

Attisano, L.; Wrana, J. L. Mads and Smads in TGF beta signalling. **Curr Opin Cell Biol,** v. 10, n. 2, p. 188-94, 1998.

Bacher, U. et al. Distribution of cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes, Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms, and the overlap MDS/MPN category. **Ann Hematol,** v. 88, n. 12, p. 1207-13, 2009.

Baker, S. J.; Rane, S. G.; Reddy, E. P. Hematopoietic cytokine receptor signaling. **Oncogene,** v. 26, n. 47, p. 6724-37, 2007.

Barbui, T.; Finazzi, M. C.; Finazzi, G. Front-line therapy in polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Blood Rev,** v. 26, n. 5, p. 205-11, 2012.

Barbui, T. et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. **J Clin Oncol,** v. 29, n. 23, p. 3179-84, 2011.

Barosi, G.; Hoffman, R. Idiopathic myelofibrosis. **Semin Hematol,** v. 42, n. 4, p. 248-58, 2005.

Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell,** v. 116, n. 2, p. 281-97, 2004.

Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell,** v. 136, n. 2, p. 215-33, 2009.

Baxter, E. J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet,** v. 365, n. 9464, p. 1054-61, 2005.

Beenken, A.; Mohammadi, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nat Rev Drug Discov,** v. 8, n. 3, p. 235-53, 2009.

Beer, P. A. et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. **Blood,** v. 112, n. 1, p. 141-9, 2008.

Beer, P. A. et al. How I treat essential thrombocythemia. **Blood,** v. 117, n. 5, p. 1472-82, 2011.

Beilharz, T. H. et al. microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. **PLoS One,** v. 4, n. 8, p. e6783, 2009.

Bertolini, F. et al. The thin red line: angiogenesis in normal and malignant hematopoiesis. **Exp Hematol,** v. 28, n. 9, p. 993-1000, 2000.

Bittencourt, R. I. et al. Essential thrombocytosis: what is vital to know. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 32, p. 162-170, 2010.

Bock, O. et al. Aberrant expression of transforming growth factor beta-1 (TGF beta-1) per se does not discriminate fibrotic from non-fibrotic chronic myeloproliferative disorders. **J Pathol,** v. 205, n. 5, p. 548-57, 2005.

Boiocchi, L. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 correlates with VEGF and microvessel density in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. **J Clin Pathol,** v. 64, n. 3, p. 226-31, 2011.

Boyd, E. M. et al. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. **Br J Haematol,** v. 149, n. 2, p. 250-7, 2010.

Bray, I. et al. MicroRNA-542-5p as a novel tumor suppressor in neuroblastoma. **Cancer Lett,** v. 303, n. 1, p. 56-64, 2011.

Brière, J. B. Essential thrombocythemia. **Orphanet J Rare Dis,** v. 2, p. 3, 2007.

Brogi, E. et al. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. **Circulation,** v. 90, n. 2, p. 649-52, 1994.

Broséus, J. et al. Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. **Leukemia,** v. 28, n. 6, p. 1374-6, 2014.

Broséus, J. et al. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. **Blood,** v. 124, n. 26, p. 3964-6, 2014.

Burns, K. et al. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. **Nature,** v. 367, n. 6462, p. 476-80, 1994.

Buysschaert, I. et al. Genetics, epigenetics and pharmaco-(epi)genomics in angiogenesis. **J Cell Mol Med,** v. 12, n. 6B, p. 2533-51, 2008.

Calin, G. A.; Croce, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer,** v. 6, n. 11, p. 857-66, 2006.

Campanelli, R. et al. Evaluation of the bioactive and total transforming growth factor β1 levels in primary myelofibrosis. **Cytokine,** v. 53, n. 1, p. 100-6, 2011.

Campbell, P. J.; Green, A. R. The myeloproliferative disorders. **N Engl J Med,** v. 355, n. 23, p. 2452-66, 2006.

Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature,** v. 438, n. 7070, p. 932-6, 2005.

Carmeliet, P.; Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature,** v. 473, n. 7347, p. 298-307, 2011.

Cazzola, M. Molecular basis of thrombocytosis. **Haematologica,** v. 93, n. 5, p. 646-8, 2008.

Cazzola, M.; Kralovics, R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. **Blood,** v. 123, n. 24, p. 3714-9, 2014.

Cervantes, F. How I treat splenomegaly in myelofibrosis. **Blood Cancer J,** v. 1, n. 10, p. e37, 2011.

Cervantes, F. et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. **Br J Haematol,** v. 118, n. 3, p. 786-90, 2002.

Cervantes, F. et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. **Blood,** v. 113, n. 13, p. 2895-901, 2009.

Cervantes, F. et al. Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol,** v. 97, n. 3, p. 635-40, 1997. ISSN 0007-1048.

Cervantes, F. et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. **Blood,** v. 122, n. 25, p. 4047-53, 2013.

Chaligné, R. et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. **Leukemia,** v. 22, n. 8, p. 1557-66, 2008.

Chang, S. H.; Hla, T. Gene regulation by RNA binding proteins and microRNAs in angiogenesis. **Trends Mol Med,** v. 17, n. 11, p. 650-8, 2011.

Chao, M. P. et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. **Sci Transl Med,** v. 2, n. 63, p. 63ra94, 2010.

Chau, J. F. et al. A crucial role for bone morphogenetic protein-Smad1 signalling in the DNA damage response. **Nat Commun,** v. 3, p. 836, 2012.

Chauffaille, M. L. L. F. Myeloproliferative neoplasms: a review of diagnostic criteria and clinical aspects. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.,** v. 32, n. 4, p. 308-316, 2010.

Chen, D.; Zhao, M.; Mundy, G. R. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors,** v. 22, n. 4, p. 233-41, Dec 2004.

Chen, M. et al. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 94, n. 13, p. 6910-5, 1997.

Chu, Y. et al. MicroRNA-590 promotes cervical cancer cell growth and invasion by targeting CHL1. **J Cell Biochem,** v. 115, n. 5, p. 847-53, 2014.

Cortelazzo, S. et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. **N Engl J Med,** v. 332, n. 17, p. 1132-6, 1995.

Dabek, J. et al. Transforming growth factor beta and cardiovascular diseases: the other facet of the 'protective cytokine'. **Pharmacol Rep,** v. 58, n. 6, p. 799-805, 2006.

de Caestecker, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 15, n. 1, p. 1-11, 2004.

Derynck, R.; Zhang, Y.; Feng, X. H. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. **Cell,** v. 95, n. 6, p. 737-40, 1998.

Derynck, R.; Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature,** v. 425, n. 6958, p. 577-84, 2003.

Dong, M.; Blobe, G. C. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. **Blood,** v. 107, n. 12, p. 4589-96, 2006.

Dos Santos, L. C. et al. Cytogenetics, JAK2 and MPL mutations in polycythemia vera, primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. **Rev Bras Hematol Hemoter,** v. 33, n. 6, p. 417-24, 2011.

Dos Santos, M. T. et al. Molecular genetic tests for JAK2V617F, Exon12_JAK2 and MPLW515K/L are highly informative in the evaluation of patients suspected to have BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. **J Clin Pathol,** v. 67, n. 2, p. 176-8, 2014.

Dweep, H. et al. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. **J Biomed Inform,** v. 44, n. 5, p. 839-47, 2011.

Eaves, C. J. et al. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. **Blood,** v. 78, n. 1, p. 110-7, 1991.

Emadi, S. et al. IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Blood,** v. 105, n. 2, p. 464-73, 2005.

Fabian, M. R.; Sonenberg, N.; Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annu Rev Biochem,** v. 79, p. 351-79, 2010.

Fabian, M. R.; Sundermeier, T. R.; Sonenberg, N. Understanding how miRNAs post-transcriptionally regulate gene expression. **Prog Mol Subcell Biol,** v. 50, p. 1-20, 2010.

Feng, X. H.; Lin, X.; Derynck, R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. **EMBO J,** v. 19, n. 19, p. 5178-93, 2000.

Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. **Semin Oncol,** v. 29, n. 6 Suppl 16, p. 10-4, 2002.

Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Rev,** v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev,** v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

Ferrara, N.; Kerbel, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature,** v. 438, n. 7070, p. 967-74, 2005.

Ferrari, G. et al. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. **J Cell Physiol,** v. 219, n. 2, p. 449-58, 2009.

Ferrari, G. et al. VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 103, n. 46, p. 17260-5, 2006.

Fialkow, P. J. et al. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. **Blood,** v. 58, n. 5, p. 916-9, 1981.

Finazzi, G.; Harrison, C. Essential thrombocythemia. **Semin Hematol,** v. 42, n. 4, p. 230-8, 2005.

Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst,** v. 82, n. 1, p. 4-6, 1990.

Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth. **Semin Cancer Biol,** v. 3, n. 2, p. 65-71, 1992.

Gabrilove, J. L. et al. Stem cell factor and basic fibroblast growth factor are synergistic in augmenting committed myeloid progenitor cell growth. **Blood,** v. 83, n. 4, p. 907-10, 1994.

Gangat, N. et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. **J Clin Oncol,** v. 29, n. 4, p. 392-7, 2011.

Gao, X. N. et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. **Oncogene,** v. 30, n. 31, p. 3416-28, 2011.

Geyer, H. L.; Mesa, R. A. Therapy for myeloproliferative neoplasms: when, which agent, and how? **Blood,** v. 124, n. 24, p. 3529-37, 2014.

Gianelli, U. et al. VEGF expression correlates with microvessel density in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders. **Am J Clin Pathol,** v. 128, n. 6, p. 966-73, 2007.

Girardot, M. et al. miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. **Blood,** v. 116, n. 3, p. 437-45, 2010.

Goldfarb, S.; Ziyadeh, F. N. TGF-beta: a crucial component of the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Trans Am Clin Climatol Assoc,** v. 112, p. 27-32, 2001.

Gougelet, A. et al. Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. **Int J Cancer,** v. 129, n. 3, p. 680-90, 2011.

Goumans, M. J.; Liu, Z.; ten Dijke, P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. **Cell Res,** v. 19, n. 1, p. 116-27, 2009.

Goumans, M. J.; Mummery, C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. **Int J Dev Biol,** v. 44, n. 3, p. 253-65, 2000.

Griesshammer, M. Options in the management of essential thrombocythaemia. **Eur J Haematol Suppl**, n. 68, p. 35-9, 2007.

Guglielmelli, P. et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. **Blood,** v. 114, n. 8, p. 1477-83, 2009.

Guglielmelli, P. et al. Calreticulin: a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms. **Expert Rev Hematol,** v. 7, n. 4, p. 423-5, 2014.

Hasselbalch, H. C. Idiopathic myelofibrosis. Clinical aspects and studies on extracellular matrix metabolism. **Dan Med Bull,** v. 40, n. 1, p. 39-55, 1993.

Hasselbalch, H. C. et al. Interferon-alpha in the treatment of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. Status and perspectives. **Curr Drug Targets,** v. 12, n. 3, p. 392-419, 2011.

Heldin, C. H.; Miyazono, K.; ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature,** v. 390, n. 6659, p. 465-71, 1997.

Hellemans, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol,** v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol,** v. 23, n. 5, p. 1011-27, 2005.

Hinshelwood, S.; Bench, A. J.; Green, A. R. Pathogenesis of polycythaemia vera. **Blood Rev,** v. 11, n. 4, p. 224-32, 1997.

Hirayama, C. et al. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. **Pharm Res,** v. 25, n. 4, p. 827-35, 2008.

Hoffman, R.; Rondelli, D. Biology and treatment of primary myelofibrosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 346-54, 2007.

Hoover, L. L.; Kubalak, S. W. Holding their own: the noncanonical roles of Smad proteins. **Sci Signal,** v. 1, n. 46, p. pe48, 2008.

Houbaviy, H. B.; Murray, M. F.; Sharp, P. A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. **Dev Cell,** v. 5, n. 2, p. 351-8, 2003.

Hussein, K. et al. MicroRNA expression profiling of megakaryocytes in primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. **Platelets,** v. 20, n. 6, p. 391-400, 2009.

Itoh, N.; Ornitz, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genet,** v. 20, n. 11, p. 563-9, 2004.

Jachimczak, P. et al. Transforming growth factor-beta-mediated autocrine growth regulation of gliomas as detected with phosphorothioate antisense oligonucleotides. **Int J Cancer,** v. 65, n. 3, p. 332-7, 1996.

Jakubowiak, A. et al. Inhibition of the transforming growth factor beta 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein. **J Biol Chem,** v. 275, n. 51, p. 40282-7, 2000.

James, C. et al. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. **Trends Mol Med,** v. 11, n. 12, p. 546-54, 2005.

James, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature,** v. 434, n. 7037, p. 1144-8, 2005.

Johansson, P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Semin Thromb Hemost,** v. 32, n. 3, p. 171-3, 2006.

Joukov, V. et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. **EMBO J,** v. 15, n. 7, p. 1751, 1996.

Kaafarani, I. et al. Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. **FASEB J,** v. 23, n. 10, p. 3424-35, 2009.

Kaminska, B.; Wesolowska, A.; Danilkiewicz, M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. **Acta Biochim Pol,** v. 52, n. 2, p. 329-37, 2005.

Kim, S. J. et al. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. **Mol Cell Biol,** v. 10, n. 4, p. 1492-7, 1990.

Kim, S. J. et al. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor-beta 1 gene. **J Biol Chem,** v. 267, n. 19, p. 13702-7, 1992.

Klagsbrun, M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. **Prog Growth Factor Res,** v. 1, n. 4, p. 207-35, 1989.

Klampfl, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med,** v. 369, n. 25, p. 2379-90, 2013.

Kobayashi, T. et al. Smad3 mediates TGF-beta1 induction of VEGF production in lung fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 327, n. 2, p. 393-8, 2005.

Koh, W. et al. Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha. **BMC Genomics,** v. 11 Suppl 1, p. S6, 2010.

Komura, E. et al. Spontaneous STAT5 activation induces growth factor independence in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FKBP51 overexpression. **Exp Hematol,** v. 31, n. 7, p. 622-30, 2003.

Kozomara, A.; Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res,** v. 42, n. Database issue, p. D68-73, 2014.

Koç, A. et al. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. **J Biol Chem,** v. 279, n. 1, p. 223-30, 2004.

Kralovics, R. Update on the biology of myeloproliferative neoplasms. In: Barbui, T. e Tefferi, A. (Ed.). **Myeloproliferative Neoplasms, Hematologic Malignancies**, 2012. p.3-10.

Kralovics, R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med,** v. 352, n. 17, p. 1779-90, 2005.

Krebs, D. L.; Hilton, D. J. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. **J Cell Sci,** v. 113 (Pt 16), p. 2813-9, 2000.

Kuehbacher, A.; Urbich, C.; Dimmeler, S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. **Trends Pharmacol Sci,** v. 29, n. 1, p. 12-5, 2008.

Kuehbacher, A. et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. **Circ Res,** v. 101, n. 1, p. 59-68, 2007.

Kurokawa, M. et al. The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. **Nature,** v. 394, n. 6688, p. 92-6, 1998.

Kvasnicka, H. M.; Thiele, J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. **Histol Histopathol,** v. 19, n. 4, p. 1245-60, Oct 2004.

Lasho, T. L.; Pardanani, A.; Tefferi, A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. **N Engl J Med,** v. 363, n. 12, p. 1189-90, 2010.

Lawrie, C. H. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. **Br J Haematol,** v. 137, n. 6, p. 503-12, 2007.

Le Bousse-Kerdilès, M. C.; Martyré, M. C. Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Ann Hematol,** v. 78, n. 10, p. 437-44, 1999.

Le Bousse-Kerdilès, M. C.; Martyré, M. C.; Myelofibrosis, F. I. r. n. o. I. Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. **Pathol Biol (Paris),** v. 49, n. 2, p. 153-7, 2001.

Le Coniat, M. et al. The human homolog of the myeloproliferative virus maps to chromosome band 1p34. **Hum Genet,** v. 83, n. 2, p. 194-6, 1989.

Lekovic, D. et al. Contribution of comorbidities and grade of bone marrow fibrosis to the prognosis of survival in patients with primary myelofibrosis. **Med Oncol,** v. 31, n. 3, p. 869, 2014.

Leonard, W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases. **Nat Rev Immunol,** v. 1, n. 3, p. 200-8, 2001.

Lev, P. R. et al. Platelets possess functional TGF-beta receptors and Smad2 protein. **Platelets,** v. 18, n. 1, p. 35-42, 2007.

Levine, R. L. Mechanisms of mutations in myeloproliferative neoplasms. **Best Pract Res Clin Haematol,** v. 22, n. 4, p. 489-94, 2009.

Levine, R. L.; Gilliland, D. G. Myeloproliferative disorders. **Blood,** v. 112, n. 6, p. 2190-8, 2008.

Levine, R. L.; Heaney, M. New advances in the pathogenesis and therapy of essential thrombocythemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 76-82, 2008.

Levine, R. L. et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nat Rev Cancer,** v. 7, n. 9, p. 673-83, 2007.

Li, J.; Zhang, Y. P.; Kirsner, R. S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech,** v. 60, n. 1, p. 107-14, 2003.

Liang, H. et al. miR-193a-3p functions as a tumor suppressor in lung cancer by down-regulating ERBB4. **J Biol Chem,** v. 290, n. 2, p. 926-40, 2015.

Lim, H.; Zhu, Y. Z. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. **Cell Mol Life Sci,** v. 63, n. 22, p. 2584-96, 2006.

Lippert, E. et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Blood,** v. 108, n. 6, p. 1865-7, 2006.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods,** v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

Lu, X. et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 102, n. 52, p. 18962-7, 2005.

Lundberg, L. G. et al. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. **Am J Pathol,** v. 157, n. 1, p. 15-9, 2000.

Lundberg, P. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. **Blood,** v. 123, n. 14, p. 2220-8, 2014.

Ma, X. et al. Prevalence of polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Am J Hematol,** v. 83, n. 5, p. 359-62, 2008.

Madri, J. A.; Pratt, B. M.; Tucker, A. M. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. **J Cell Biol,** v. 106, n. 4, p. 1375-84, 1988.

Mangi, M. H.; Newland, A. C. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. **Br J Haematol,** v. 111, n. 1, p. 43-51, 2000.

Manoharan, A.; Horsley, R.; Pitney, W. R. The reticulin content of bone marrow in acute leukaemia in adults. **Br J Haematol,** v. 43, n. 2, p. 185-90, 1979.

Martyré, M. C. et al. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol,** v. 97, n. 2, p. 441-8, 1997.

Martyré, M. C. et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol,** v. 88, n. 1, p. 9-16, 1994.

Massagué, J. TGF-beta signal transduction. **Annu Rev Biochem,** v. 67, p. 753-91, 1998.

Massagué, J. How cells read TGF-beta signals. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 1, n. 3, p. 169-78, 2000.

Massagué, J.; Blain, S. W.; Lo, R. S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. **Cell,** v. 103, n. 2, p. 295-309, 2000.

Massagué, J.; Seoane, J.; Wotton, D. Smad transcription factors. **Genes Dev,** v. 19, n. 23, p. 2783-810, 2005.

Matsumoto, T.; Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction. **Sci STKE,** v. 2001, n. 112, p. re21, 2001.

McGaffin, G. et al. JAK2 V617F and CALR mutations are not mutually exclusive; findings from retrospective analysis of a small patient cohort. **Br J Haematol,** v. 167, n. 2, p. 276-8, 2014.

Medinger, M.; Passweg, J. Angiogenesis in myeloproliferative neoplasms, new markers and future directions. **Memo,** v. 7, p. 206-210, 2014.

Meier, B.; Burton, J. H. Myeloproliferative disorders. **Emerg Med Clin North Am,** v. 32, n. 3, p. 597-612, 2014.

Mesa, R. A. How I treat symptomatic splenomegaly in patients with myelofibrosis. **Blood,** v. 113, n. 22, p. 5394-400, 2009.

Mesa, R. A. Assessing new therapies and their overall impact in myelofibrosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program,** v. 2010, p. 115-21, 2010.

Mesa, R. A. et al. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. **Blood,** v. 105, n. 3, p. 973-7, 2005.

Mesa, R. A. et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international Internet-based survey of 1179 MPD patients. **Cancer,** v. 109, n. 1, p. 68-76, 2007.

Mesa, R. A. et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. **Am J Hematol,** v. 61, n. 1, p. 10-5, 1999.

Mesa, R. A. et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). **Leuk Res,** v. 31, n. 6, p. 737-40, 2007.

Michiels, J. J. et al. Erythromelalgia caused by platelet-mediated arteriolar inflammation and thrombosis in thrombocythemia. **Ann Intern Med,** v. 102, n. 4, p. 466-71, 1985.

Mignotte, V. et al. Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL). **Genomics,** v. 20, n. 1, p. 5-12, 1994.

Mitelman, F.; Mertens, F.; Johansson, B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. **Nat Genet,** v. 15 Spec No, p. 417-74, 1997.

Miyamoto, T. et al. Overexpression of Smad6 exacerbates pancreatic fibrosis in murine caerulein-induced chronic pancreatic injuries. **Pancreas,** v. 39, n. 3, p. 385-91, 2010.

Miyazono, K.; Kamiya, Y.; Morikawa, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. **J Biochem,** v. 147, n. 1, p. 35-51, 2010.

Moliterno, A. R. et al. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. **Blood,** v. 108, n. 12, p. 3913-5, 2006.

Monte-Mór, B. C. R. et al. JAK2 V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia. **Genetics and Molecular Biology,** v. 30, n. 2, p. 241-248, 2007.

Munoz, O. et al. TGFbeta-mediated activation of Smad1 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and effect on cell proliferation. **Leukemia,** v. 18, n. 12, p. 2015-25, 2004.

Murphy-Ullrich, J. E.; Poczatek, M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 11, n. 1-2, p. 59-69, 2000.

Nakagawa, T. et al. TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. **Kidney Int,** v. 66, n. 2, p. 605-13, 2004.

Nangalia, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. **N Engl J Med,** v. 369, n. 25, p. 2391-405, 2013.

Neubauer, H. et al. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. **Cell,** v. 93, n. 3, p. 397-409, 1998.

Oh, S. T. et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. **Blood,** v. 116, n. 6, p. 988-92, 2010.

Olofsson, B. et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 93, n. 6, p. 2576-81, 1996.

Olsen, S. K. et al. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. **J Biol Chem,** v. 278, n. 36, p. 34226-36, 2003.

Ortmann, C. A. et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med,** v. 372, n. 7, p. 601-12, 2015.

Panteli, K. et al. Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases detected by CD34 expression. **Eur J Haematol,** v. 72, n. 6, p. 410-5, 2004.

Panteli, K. E. et al. Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. **Br J Haematol,** v. 130, n. 5, p. 709-15, 2005.

Pardali, K.; Moustakas, A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. **Biochim Biophys Acta,** v. 1775, n. 1, p. 21-62, 2007.

Pardanani, A. D. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. **Blood,** v. 108, n. 10, p. 3472-6, 2006.

Parganas, E. et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. **Cell,** v. 93, n. 3, p. 385-95, 1998.

Pasquinelli, A. E.; Hunter, S.; Bracht, J. MicroRNAs: a developing story. **Curr Opin Genet Dev,** v. 15, n. 2, p. 200-5, 2005.

Passamonti, F. et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). **Blood,** v. 115, n. 9, p. 1703-8, 2010.

Passamonti, F.; Rumi, E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. **Haematologica,** v. 94, n. 1, p. 7-10, 2009.

Passamonti, F. et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. **Blood,** v. 107, n. 9, p. 3676-82, 2006.

Passamonti, F. et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Am J Med,** v. 117, n. 10, p. 755-61, 2004.

Passamonti, F. et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. **Blood,** v. 120, n. 6, p. 1197-201, 2012.

Patnaik, M. M. et al. Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival. **Eur J Haematol,** v. 84, n. 2, p. 105-8, 2010.

Pecquet, C. et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. **Blood,** v. 115, n. 5, p. 1037-48, 2010.

Pietenpol, J. A. et al. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. **Cell,** v. 61, n. 5, p. 777-85, 1990.

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

Polverini, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med,** v. 6, n. 3, p. 230-47, 1995.

Ponce, C. C. et al. MPL immunohistochemical expression as a novel marker for essential thrombocythemia and primary myelofibrosis differential diagnosis. **Leuk Res,** v. 36, n. 1, p. 93-7, 2012.

Ponce, C. C. et al. Increased angiogenesis in primary myelofibrosis: latent transforming growth factor-β as a possible angiogenic factor. **Rev Bras Hematol Hemoter,** v. 36, n. 5, p. 322-8, 2014.

Presta, M. et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 16, n. 2, p. 159-78, 2005.

Pritchard, M. A. et al. Two members of the JAK family of protein tyrosine kinases map to chromosomes 1p31.3 and 9p24. **Mamm Genome,** v. 3, n. 1, p. 36-8, 1992.

Qiao, C. et al. Clinical importance of different calreticulin gene mutation types in wild-type JAK2 essential thrombocythemia and myelofibrosis patients. **Haematologica,** v. 99, n. 10, p. e182-4, 2014.

Quintás-Cardama, A. et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. **Nat Rev Drug Discov,** v. 10, n. 2, p. 127-40, 2011.

Roberts, A. B. et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 83, n. 12, p. 4167-71, 1986.

Rotunno, G. et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. **Blood,** v. 123, n. 10, p. 1552-5, 2014.

Rumi, E. et al. Validation of cytogenetic-based risk stratification in primary myelofibrosis. **Blood,** v. 115, n. 13, p. 2719-20, 2010.

Rumi, E. et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. **Blood,** v. 123, n. 10, p. 1544-51, 2014.

Saharinen, P.; Takaluoma, K.; Silvennoinen, O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. **Mol Cell Biol,** v. 20, n. 10, p. 3387-95, 2000.

Saint-Martin, C. et al. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. **Blood,** v. 114, n. 8, p. 1628-32, 2009.

Saltzman, A. et al. Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: high mRNA expression in immune cells and muscle tissue. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 246, n. 3, p. 627-33, 1998.

Schindler, C.; Darnell, J. E. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. **Annu Rev Biochem,** v. 64, p. 621-51, 1995.

Schäfer, M.; Werner, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 9, n. 8, p. 628-38, 2008.

Seghezzi, G. et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. **J Cell Biol,** v. 141, n. 7, p. 1659-73, 1998.

Shi, Y.; Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell,** v. 113, n. 6, p. 685-700, 2003.

Shirane, S. et al. JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. **Haematologica,** v. 100, n. 2, p. e46-8, 2015.

Silva, M. et al. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. **N Engl J Med,** v. 338, n. 9, p. 564-71, 1998.

Skov, V. et al. Molecular profiling of peripheral blood cells from patients with polycythemia vera and related neoplasms: identification of deregulated genes of significance for inflammation and immune surveillance. **Leuk Res,** v. 36, n. 11, p. 1387-92, 2012.

Souza, M. C. et al. Application of five prognostic survival scores to primary myelofibrosis in 62 Brazilian patients. **Med Oncol,** v. 30, n. 2, p. 555, 2013.

Spivak, J. L. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. **Semin Hematol,** v. 41, n. 2 Suppl 3, p. 1-5, 2004.

Spivak, J. L.; Silver, R. T. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. **Blood,** v. 112, n. 2, p. 231-9, 2008.

Sporn, M. B.; Roberts, A. B. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. **J Cell Biol,** v. 119, n. 5, p. 1017-21, 1992.

Staerk, J. et al. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. **Blood,** v. 107, n. 5, p. 1864-71, 2006.

Stein, B. L. et al. Sex differences in the JAK2 V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. **Haematologica,** v. 95, n. 7, p. 1090-7, 2010.

Su, E.; Han, X.; Jiang, G. The transforming growth factor beta 1/SMAD signaling pathway involved in human chronic myeloid leukemia. **Tumori,** v. 96, n. 5, p. 659-66, 2010.

Sánchez-Elsner, T. et al. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. **J Biol Chem,** v. 276, n. 42, p. 38527-35, 2001.

Tefferi, A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. **N Engl J Med,** v. 342, n. 17, p. 1255-65, 2000.

Tefferi, A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. **J Clin Oncol,** v. 23, n. 33, p. 8520-30, 2005.

Tefferi, A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. **Leukemia,** v. 22, n. 1, p. 3-13, 2008.

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. 1128-38, 2010.

Tefferi, A. Challenges facing JAK inhibitor therapy for myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med,** v. 366, n. 9, p. 844-6, 2012.

Tefferi, A. et al. 20+ yr without leukemic or fibrotic transformation in essential thrombocythemia or polycythemia vera: predictors at diagnosis. **Eur J Haematol,** v. 80, n. 5, p. 386-90, 2008.

Tefferi, A.; Gilliland, D. G. The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. **Mayo Clin Proc,** v. 80, n. 7, p. 947-58, 2005.

Tefferi, A.; Gilliland, G. Classification of chronic myeloid disorders: from Dameshek towards a semi-molecular system. **Best Pract Res Clin Haematol,** v. 19, n. 3, p. 365-85, 2006.

Tefferi, A. et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. **Leukemia,** v. 28, n. 7, p. 1568-70, 2014.

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

Tefferi, A. et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFRA correlates. **Leukemia,** v. 23, n. 5, p. 900-4, 2009.

Tefferi, A.; Litzow, M. R.; Pardanani, A. Long-term outcome of treatment with ruxolitinib in myelofibrosis. **N Engl J Med,** v. 365, n. 15, p. 1455-7, 2011.

Tefferi, A.; Pardanani, A. Genetics: CALR mutations and a new diagnostic algorithm for MPN. **Nat Rev Clin Oncol,** v. 11, n. 3, p. 125-6, 2014.

Tefferi, A. et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. **Leukemia,** v. 27, n. 9, p. 1874-81, 2013.

Tefferi, A.; Skoda, R.; Vardiman, J. W. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. **Nat Rev Clin Oncol,** v. 6, n. 11, p. 627-37, 2009.

Tefferi, A. et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. **Blood,** v. 110, n. 4, p. 1092-7, 2007.

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. **J Clin Oncol,** v. 29, n. 10, p. 1356-63, 2011.

Tefferi, A.; Vainchenker, W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. **J Clin Oncol,** v. 29, n. 5, p. 573-82, 2011.

Tefferi, A.; Vardiman, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia,** v. 22, n. 1, p. 14-22, 2008.

Tefferi, A. et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. **Am J Hematol,** v. 89, n. 8, p. E121-4, 2014.

Tefferi, A. et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. **Leukemia,** v. 28, n. 12, p. 2300-3, 2014.

Thiele, J. et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. **Haematologica,** v. 90, n. 8, p. 1128-32, 2005.

Tiedt, R. et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. **Blood,** v. 111, n. 8, p. 3931-40, 2008.

Titmarsh, G. J. et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. **Am J Hematol,** v. 89, n. 6, p. 581-7, 2014.

Tsai, J. C.; Goldman, C. K.; Gillespie, G. Y. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. **J Neurosurg,** v. 82, n. 5, p. 864-73, 1995.

Turner, N.; Grose, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 10, n. 2, p. 116-29, 2010.

Ugo, V. et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. **Exp Hematol,** v. 32, n. 2, p. 179-87, 2004.

Van Obberghen-Schilling, E. et al. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. **J Biol Chem,** v. 263, n. 16, p. 7741-6, 1988.

Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol,** v. 3, n. 7, p. 2002.

Vannucchi, A. M. et al. A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase 3 trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. **Haematologica**, 2015.

Vardiman, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood,** v. 114, n. 5, p. 937-51, 2009.

Vasudevan, S.; Tong, Y.; Steitz, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science,** v. 318, n. 5858, p. 1931-4, 2007.

Veikkola, T. et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. **Cancer Res,** v. 60, n. 2, p. 203-12, 2000.

Verstovsek, S. et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. **N Engl J Med,** v. 363, n. 12, p. 1117-27, 2010.

Vianello, F. et al. Coronary microvascular dysfunction due to essential thrombocythemia and policythemia vera: the missing piece in the puzzle of their increased cardiovascular risk? **Am J Hematol,** v. 90, n. 2, p. 109-13, 2015.

Villapol, S.; Logan, T. T.; Symes, A. J. **Role of TGF-β Signaling in Neurogenic Regions After Brain Injury**. In: Wislet-Gendebien, S. (Ed.). **Trends in cell signaling pathways in neuronal fate decision**: *InTech*, 2013.

Wang, L. et al. Transforming growth factor-beta1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via mitogen-activated protein kinase kinase 3-p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in murine mesangial cells. **J Biol Chem,** v. 279, n. 32, p. 33213-9, 2004.

Waugh, D. J.; Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res,** v. 14, n. 21, p. 6735-41, 2008.

Wilks, A. F. et al. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. **Mol Cell Biol,** v. 11, n. 4, p. 2057-65, 1991.

Winter, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol,** v. 11, n. 3, p. 228-34, 2009.

Wrana, J. L. Crossing Smads. **Sci STKE,** v. 2000, n. 23, p. re1, 2000.

Wróbel, T. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in bone marrow of patients with myeloproliferative disorders (MPD). **Pathol Oncol Res,** v. 9, n. 3, p. 170-3, 2003.

Wu, Z. et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. **J Hematol Oncol,** v. 7, p. 48, 2014.

Xiao, X. et al. Enhancement of proliferation and invasion by MicroRNA-590-5p via targeting PBRM1 in clear cell renal carcinoma cells. **Oncol Res,** v. 20, n. 11, p. 537-44, 2013.

Xu, N. et al. A report on the co-occurrence of JAK2V617F and CALR mutations in myeloproliferative neoplasm patients. **Ann Hematol**, 2014.

Yamaguchi, G. et al. Isolation of miRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 420, n. 2, p. 411-6, 2012.

Yang, E. Y.; Moses, H. L. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. **J Cell Biol,** v. 111, n. 2, p. 731-41, 1990.

Yang, H. et al. Roles of miR-590-5p and miR-590-3p in the development of hepatocellular carcinoma. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao,** v. 33, n. 6, p. 804-11, 2013.

Zamora, L. et al. "Co-existence of JAK2 V617F and CALR mutations in primary myelofibrosis.". **Leuk Lymphoma**, p. 1-6, 2015.

Zittermann, S. I.; Issekutz, A. C. Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation. **J Leukoc Biol,** v. 80, n. 2, p. 247-57, 2006.

ANEXOS

ANEXO A – Informações para os Membros da Banca Julgadora de Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós- Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

ANEXO B - Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROJETO DE PESQUISA

Título: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-ß1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial

Área Temática:

Área 9. A critério do CEP.

Versão: 3

CAAE: 04737312.1.0000.0067

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 88.940

Data da Relatoria: 27/08/2012

Apresentação do Projeto:

A angiogênese possui papel importante nas neoplasias mieloproliferativas (NMPs), como mielofibrose primária (MFP) e trombocitemia essencial (TE). A angiogênese é considerada um processo crucial para crescimento e metástase tumoral. Dentre as várias citocinas e fatores de crescimento que modulam a angiogênese, os principais são fator transformador do crescimento (TGF)-ß1, fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF).

O presente estudo busca uma melhor compreensão do papel da angiogênese na MFP e TE e possui como objetivo geral investigar o efeito de RNAm da família de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-ß1 e seu papel na fisiopatologia da angiogênese em pacientes com MFP e TE.

O estudo propõe incluir 240 sujeitos de pesquisa: 80 portadores de MFP e TE atendidos na Disciplina de Hematologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e de 160 sujeitos saudáveis voluntários da Universidade de São Paulo (USP) e da comunidade. Os sujeitos da pesquisa terão idade superior a 18 anos e serão emparelhados consoante gênero e idade.

Todos os 80 pacientes e 160 controles serão submetidos à punção venosa para a coleta de sangue periférico. Para cerca de 30 pacientes ao diagnóstico e para aqueles em que houver indicação clínica, será colhida também a medula óssea. A medula óssea e a história clínica de cada um dos pacientes serão adquiridas pelo médico responsável pelo paciente.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo busca uma melhor compreensão do papel da angiogênese na MFP e na TE e possui como objetivo geral investigar o efeito de RNAm da família de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-ß1 e seu papel na fisiopatologia da angiogênese em pacientes com MFP e TE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco relacionado à coleta de sangue venoso periférico: mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Risco relacionado à coleta de medula óssea: a coleta de medula óssea será feita independentemente do presente estudo, pois é realizada como exame assistencial para diagnóstico ou acompanhamento da doença.

Benefícios: não haverá benefícios diretos para os indivíduos saudáveis, no entanto, os pacientes

Endereço: Av.Profº Lineu Prestes, nº 580 - Bloco 17 -
Bairro: superior - Butantã **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11-)3091-3785 **Fax:** (11-)3091-3677 **E-mail:** cepfcf@usp.br

portadores de mielofibrose primária e trombocitemia essencial poderão ter benefícios indiretos do melhor entendimento da fisiopatologia dessas doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa possui como instituição proponente a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP e o seu responsável é a Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara.

O projeto conta com co-participação de duas instituições:
(1) Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP (Colaborador: Profa. Dra. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille).
(2) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP (Colaborador: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro).

Os pacientes serão provenientes da UNIFESP (Disciplina de Hematologia), onde serão obtidas história clínica, amostra de sangue periférico e de medula óssea (quando indicada clinicamente) pelo médico responsável pelo paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. A folha de rosto encontra-se adequada e assinada pelo responsável da Instituição Proponente.
2. TCLEs estão apresentados de forma adequada.

Recomendações:

O responsável pelo projeto respondeu adequadamente às pendências:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto se encontra adequado para aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP/FCF em reunião de 27 de agosto de 2012 aprovou o presente projeto.

SAO PAULO, 03 de Setembro de 2012

Assinado por:
Cristina Helena dos Reis Serra

Endereço: Av.Profº Lineu Prestes, nº 580 - Bloco 17 -
Bairro: superior - Butantã **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11-)3091-3785 **Fax:** (11-)3091-3677 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO C - Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP/ HOSPITAL SÃO PAULO

PROJETO DE PESQUISA

Título: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-ß1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 04737312.1.0000.0067

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
Elaborado pela Instituição Coparticipante

Número do Parecer: 86717

Data da Relatoria: 31/08/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Objetivo da Pesquisa:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Recomendações:

Nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência atendida - apresentado novo TCLE incluindo a instituição co-participante UNIFESP - PROJETO APROVADO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@epm.br;arpmeleti@unifesp.br

Considerações Finais a critério do CEP:

As pendências foram atendidas, o colegiado acatou o parecer do relator. Projeto aprovado.

SAO PAULO, 31 de Agosto de 2012

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@epm.br;arpmeleti@unifesp.br

ANEXO D - Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Pontifícia Universidade Católica, campus Sorocaba

PUC-SP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SÃO PAULO-PUC/SP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-ß1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara
Área Temática:
Versão: 5
CAAE: 04737312.3.3001.5482
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 753.280
Data da Relatoria: 11/08/2014

Apresentação do Projeto:
A presente submissão é um adendo de projeto já aprovado por este CEP em 05 de agosto de 2013 (sob o número do parecer 349.654) e que atualmente está em andamento. O projeto busca uma melhor compreensão do papel da angiogênese, englobando mielofibrose primária, trombocitemia essencial e policitemia vera. Neste adendo, a pesquisadora solicita a inclusão do Serviço de Hematologia do Hospital Leonor Mendes de Barros, da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da PUC-SP, devido a dificuldade de se obter o número significativo de amostras de pacientes participantes da pesquisa provenientes da UNIFESP.

Adendo do CEP-PUC/SP: tendo em vista a presente solicitação, juntamente com a carta de ANUÊNCIA do Prof. Dr. Godofredo Campos Borges, diretor da Faculdade de Ciências Médicas (FCMS - PUC/SP) deferimos o referido pedido.

Objetivo da Pesquisa:
Investigar em pacientes com neoplasia mieloproliferativa e em controles o efeito da expressão de RNAm da família das Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-beta1, bem como avaliar a expressão dos genes de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores fisiológicos, determinar a concentração plasmática dessas proteínas e investigar a metilação de DNA e

Endereço: Rua Ministro Godói, 969 - sala 63 C
Bairro: Perdizes **CEP:** 05.015-001
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3670-8466 **Fax:** (11)3670-8466 **E-mail:** cometica@pucsp.br

polimorfismos dos genes propostos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo e conforme texto do parecer 571.670

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo e conforme texto do parecer 571.670

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo e conforme texto do parecer 571.670: "(...) Recomenda-se a aprovação da inclusão do novo centro como colaborador do presente projeto de pesquisa."

Adendo do CEP-PUC/SP: tendo em vista a presente solicitação, juntamente com a carta de ANUÊNCIA do Prof. Dr. Godofredo Campos Borges, diretor da Faculdade de Ciências Médicas (FCMS - PUC/SP) deferimos o referido pedido.

Recomendações:

De acordo e conforme texto do parecer 571.670: "(...) Recomenda-se a aprovação da inclusão do novo centro como colaborador do presente projeto de pesquisa."

Adendo do CEP-PUC/SP: tendo em vista a presente solicitação, juntamente com a carta de ANUÊNCIA do Prof. Dr. Godofredo Campos Borges, diretor da Faculdade de Ciências Médicas (FCMS - PUC/SP) deferimos o referido pedido.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem Pendências e Lista de Inadequações, portanto, somos de parecer favorável à aprovação e realização do projeto de pesquisa em tela.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Ministro Godói, 969 - sala 63 C
Bairro: Perdizes **CEP:** 05.015-001
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3670-8466 **Fax:** (11)3670-8466 **E-mail:** cometica@pucsp.br

SAO PAULO, 15 de Agosto de 2014

Assinado por:
Edgard de Assis Carvalho
(Coordenador)

Endereço: Rua Ministro Godói, 969 - sala 63 C
Bairro: Perdizes **CEP:** 05.015-001
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3670-8466 **Fax:** (11)3670-8466 **E-mail:** cometica@pucsp.br

ANEXO E - Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo, referente ao adendo para pesquisa de mutações no gene *CALR*

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-ß1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara
Área Temática:
Versão: 6
CAAE: 04737312.1.0000.0067
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 890.787
Data da Relatoria: 23/11/2014

Apresentação do Projeto:
A presente submissão é um adendo de projeto já aprovado por este CEP em 27 de março de 2014 (sob o número do parecer 571.670) e que atualmente está em andamento. O projeto busca uma melhor compreensão do papel da fisiopatologia da angiogênese nas neoplasias mieloproliferativas, englobando mielofibrose primária, trombocitemia essencial e policitemia vera. No presente adendo, a pesquisadora solícita a inclusão da pesquisa da mutação do gene da calreticulina (CALR) nas amostras de DNA armazenadas dos pacientes incluídos no estudo. Vale ressaltar que esta mutação foi descoberta recentemente nos pacientes com neoplasias mieloproliferativas.

Objetivo da Pesquisa:
Investigar em pacientes com neoplasia mieloproliferativa e em controles o efeito da expressão de RNAm da família das Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-beta1, bem como avaliar a expressão dos genes de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores fisiológicos, determinar a concentração plasmática dessas proteínas e investigar a metilação de DNA e polimorfismos dos genes propostos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Risco relacionado à coleta de sangue venoso periférico: mínimo. A coleta de sangue poderá formar

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.
Risco relacionado à coleta de medula óssea: a coleta de medula óssea será feita independentemente do presente estudo em alguns pacientes, pois é realizada como exame assistencial para diagnóstico ou acompanhamento da doença.
Benefícios: não haverá benefícios diretos para os indivíduos saudáveis; no entanto, os pacientes com mielofibrose primária, trombocitemia essencial e policitemia vera poderão ter benefícios indiretos do melhor entendimento da fisiopatologia dessas doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de extrema importância para o melhor entendimento da fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora solicita a dispensa do TCLE para essa nova análise (mutação da CALR) nas amostras de DNA armazenadas. A pesquisadora justifica que desde o início das coletas (03/2012) diversos pacientes faleceram, visto que apresentavam doenças onco-hematológicas graves. De fato, em experiências anteriores, as tentativas de contato resultaram na localização da minoria dos participantes, além do inconveniente de parentes relatarem o falecimento.

Recomendações:

A nova solicitação de análise está incluída no escopo das análises genéticas que constam no TCLE ("genes no seu DNA relacionados às doenças mielofibrose primária, trombocitemia essencial e policitemia vera") e que, portanto, não altera o objetivo da pesquisa. Recomenda-se a aprovação do adendo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se a aprovação do adendo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o adendo pode ser aprovado.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

SAO PAULO, 28 de Novembro de 2014

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO F – Currículo Lattes

Daniela Prudente Teixeira Nunes

Dados pessoais

Nome Daniela Prudente Teixeira Nunes
Filiação Ramon Lombardi Teixeira Nunes e Myriam Daniele Prudente Teixeira Nunes

Formação acadêmica/titulação

2012 - 2015 Doutorado em Análises Clínicas.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
Título: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-B1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial
Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2008 - 2010 Mestrado em Ciências da Saúde.
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, Sao Jose Do Rio Preto, Brasil
Título: Polimorfismo G22A do gene ADA e abortamento espontâneo recorrente: ausência de associação, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Luiz Carlos de Mattos
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2004 - 2007 Graduação em Bacharelado em Biomedicina.
Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Brasil
Título: Resultados de hemogramas realizados durante o desenvolvimento do projeto de Ação Social
Orientador: Nilce Barril

Formação complementar

2012 - 2012 Curso de curta duração em Workshop de Capacitação Web of Science & JCR.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP São Paulo, FCF-USP, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em Semana de Inovações Biológicas e Biotecnológicas.
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, ICB USP, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em El componente genético de enfermedades complejas.
Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP-FCF, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Segurança em resíduos químicos.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Next Generation Sequencing.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP São Paulo, FCF-USP, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Curso Pró-Saúde.
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, Sao Jose Do Rio Preto, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em IV Curso de Atualização do Laboratório ReproTox.
Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Investigação laboratorial dos grupos sanguíneos e.
Academia de Ciência e Tecnologia, AC&T, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Sorologia de Banco de Sangue: Montagem técnica....
Academia de Ciência e Tecnologia, AC&T, Brasil

2010 - 2010 Extensão universitária em Imunologia Básica e Avançada.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Introdução à Biologia Molecular.
Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Técnicas de apresentação: Oral e Pôsteres.
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, Sao Jose Do Rio Preto, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Aconselhamento Genético na Era da Genômica.
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de Sâo José do Rio Preto, UNESP, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Treinamento do Portal de Periódicos da Capes.
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, Sao Jose Do Rio Preto, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Reprodução Assistida.
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de Sâo José do Rio Preto, UNESP, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Ferramentas genéticas na detecção da biodiversid..
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de Sâo José do Rio Preto, UNESP, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Do Genótipo ao Fenótipo.
Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Pipetas Gilson: como aumentar a vida útil.
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de Sâo José do Rio Preto, UNESP, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Técnicas de Citogenética Humana.
Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Inglês Instrumental para Genética.
America English School, AES, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Ferramentas de Bio. Mol. no estudo de doenças hum..
Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Anemias.
Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Coleta sanguínea.
Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - FCF-USP

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Doutoranda , Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2011 - 2012 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Bolsista de Apoio Técnico a Pesquisa do CNPq, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

07/2012 - 12/2012 Treinamento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

Especificação:
Aluna Bolsista do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE). Monitora da disciplina de Hematologia Clínica.

2. The University of Texas MD Anderson Cancer Center - MDACC

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Trainee, Enquadramento funcional: Trainee, Carga horária: 40, Regime: Integral

3. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 8, Regime: Parcial

2008 - 2010 Vínculo: Mestranda em Ciências da Saúde, Enquadramento funcional: Estudante de Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2008 - 2010 Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estágio em aulas práticas, Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades

03/2008 - 09/2008 Estágio, Departamento de Biologia Molecular, Laboratório de Imunogenética

Estágio:
Estágio em Imunohematologia

4. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de Sâo José do Rio Preto - UNESP

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Aluno especial PPGGEN, Enquadramento funcional: Aluno especial, Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades

03/2008 - 06/2009 Outra atividade técnico-científica, Departamento de Biologia
Especificação:
Seminários Temáticos de Ética em Pesquisa

03/2008 - 06/2008 Outra atividade técnico-científica, Departamento de Biologia
Especificação:
Marcadores Genéticos

5. Laboratório Casella de Análises Clínicas - Santa Fé do Sul - LCAC

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Análises Clínicas - Ambulatório, Carga horária: 32, Regime: Parcial

Atividades

07/2007 - 07/2007 Estágio, Laboratório de Análises Clínicas
Estágio:
Coleta, Triagem, Hematologia, Urinálise, Bioquímica

6. Santa Casa de Misericórdia de Votuporanga - SCMV

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Ressonância Magnética, Carga horária: 25, Regime: Parcial

Atividades

07/2007 - 07/2007 Estágio, Ressonância Magnética
Estágio:
Estágio em ressonância magnética

7. Santa Casa de Misericórdia de Santa Fé do Sul - SCMSFS

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Análises Clínicas - Laboratório de urgência, Carga horária: 32, Regime: Parcial

Atividades

07/2007 - 07/2007 Estágio, Laboratório de Análises Clínicas
Estágio:
Laboratório de urgência

8. Centro Universitário de Votuporanga - UNIFEV

Vínculo institucional

2004 - 2007 Vínculo: Acadêmica, Enquadramento funcional: Graduanda, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Revisor de periódico

1. Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde

Vínculo

2014 - Atual Regime: Parcial

2. International Journal of Nursing and Midwifery

Vínculo

2013 - Atual Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Hematologia
2. Biologia Molecular
3. Imunogenética
4. Reprodução Humana

Projetos

Projetos de pesquisa

2012 - Atual Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGFβ1 seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);
Integrantes: Daniela Prudente Teixeira Nunes; Elvira (Responsável); Guilherme Wataru Gomes; Fabíola Attié de Castro; Chauffaille; Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille; Maria Regina Régis Silva; César Cilento Ponce; Celina Garcia Yassui; Luciene Terezina de Lima
Financiador(es): Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo-FCF-USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP Ribeirão Preto-FCF-USP RP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP

2012 - Atual Expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em linhagens celulares tratadas com inibidor comercial da via JAK-STAT
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Daniela Prudente Teixeira Nunes; Elvira Maria Guerra-Shinohara (Responsável);

Guilherme Wataru Gomes; Fabíola Attié de Castro; Luciene Terezina de Lima

2012 - Atual PAPEL DAS METALOPROTEINASES E DE SEUS REGULADORES NA ANGIOGÊNESE DE PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado acadêmico (1); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (2);
Integrantes: Daniela Prudente Teixeira Nunes; Elvira (Responsável); Guilherme Wataru Gomes; Fabíola Attié de Castro; Maria Regina; César; Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille; Luciene Terezina de Lima; Marcelo Cliquet; Marcos Tadeu dos Santos; Miguel Mitne Neto

2008 - 2010 Incompatibilidades pelo sistema ABO, polimorfismo Taq I do gene ADA (20q13.11) e aborto espontâneo recorrente: um estudo de associação.
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (0); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);
Integrantes: Daniela Prudente Teixeira Nunes; Luiz Carlos de Mattos (Responsável); Antonio Helio Oliani; Denise Cristina M. Vaz; Cinara De Cassia Brandao de Mattos; Ligia Cosentino Junqueira Franco Spegiorin
Financiador(es): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto-FUNFARME
Número de produções C,T & A: 11/
2007 - 2007 Resultados de hemogramas realizados durante o desenvolvimento do projeto de Ação Social
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);
Integrantes: Daniela Prudente Teixeira Nunes; Nilce Barril (Responsável)
Financiador(es): Centro Universitário de Votuporanga-UNIFEV
Número de produções C,T & A: 3/

Prêmios e títulos

2012 Visitor Training Program, American Society of Hematology

2010 Melhor Pôster pelo trabalho "Ausência de associação entre o aborto espontâneo recorrente e polimorfismo TaqI do gene ADA", SOGESP- Sociedade de Obstetrícia e Ginecologia do Estado de São Paulo

Producão

Produção bibliográfica
Artigos completos publicados em periódicos

1. **Teixeira Nunes, Daniela P**; Lima, Luciene T; Chauffaille, Maria de L; Mitne-Neto, Miguel; dos Santos, Marcos T; Cliquet, Marcelo G; Guerra-Shinohara, Elvira M
CALR mutations screening in wild type JAK2V617F and MPLW515K/L Brazilian myeloproliferative neoplasms patients. Blood Cells, Molecules & Diseases (Print)., v.3, p.236 - 240, 2015.

2. CAMARGO, U., TOLEDO, R.A., CINTRA, J.R., **NUNES, D.P.T.**, ACAYABA DE TOLEDO, R., BRANDÃO DE MATTOS, C.C., MATTOS, L.C.
Lack of association of the G22A polymorphism of the ADA gene in patients with ankylosing spondylitis. Genetics and Molecular Research. , v.11, p.1178 - 1184, 2012.

3. **NUNES, D. P. T.**, SPEGIORIN, L. C. J. F., MATTOS, C. C. B., OLIANI, A. H., VAZ-OLIANI D.C.,

MATTOS, L. C.
The ADA*2 allele of the adenosine deaminase gene (20q13.11) and recurrent spontaneous abortions: an age-dependent association. Clinics (USP. Impresso). v.66, p.1929 - 1933, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Gomes, GW, Castro, FA de, **NUNES, Daniela Prudente Teixeira**, Luciene Terezina de Lima, RODRIGUES, A. C., TOGNON- RIBEIRO, R., ELVIRA MARIA GUERRA-SHINOHARA
ABCB1 AND SLC22A1 MRNA EXPRESSIONS ARE INCREASED IN A HOMOZYGOUS JAK2V617F CELL LINE TREATED WITH JAK INHIBITOR In: 20th Congress of the European Hematology Association, 2015, Vienna.
20th Congress of the European Hematology Association. , 2015.

2. Luciene Terezina de Lima, **NUNES, D. P. T.**, Gomes, GW, CHAUFFAILLE, M. L. L. F., Maria Regina Regis Silva, César Cilento Ponce, Castro, FA de, CLIQUET, M., SANTOS, M. T., Miguel Mitne Neto, ELVIRA MARIA GUERRA-SHINOHARA
SERUM LEVELS OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR TISSUE INHIBITORS ARE ELEVATED IN JAK2V617F MUTATED COMPARED TO CALR MUTATED MYELOFIBROSIS AND TRIPLE NEGATIVE ESSENTIAL THROMBOCYTEMIA PATIENTS In: 20th Congress of the European Hematology Association, 2015, Vienna.
20th Congress of the European Hematology Association. , 2015.

3. Luciene Terezina de Lima, **DANIELA PT NUNES**, Gomes, GW, CHAUFFAILLE, M. L. L. F., Maria Regina Regis Silva, César Cilento Ponce, Castro, FA de, CLIQUET, M., SANTOS, M. T., Miguel Mitne Neto, ELVIRA MARIA GUERRA-SHINOHARA
Serum levels of matrix metalloproteinases and their tssue inhibitors are decreased in CALR mutated myelofibrosis and triple negative essential thrombocythemia patients In: 11th International Calreticulin Workshop: Unfolding the Complexities of ER Chaperones in Health and Disease, 2015, New York.
Calreticulin Workshop. , 2015.

4. **DANIELA P. T. Nunes**, Luciene Terezina de Lima, Gomes, GW, CHAUFFAILLE, M. L. L. F., Silva, M. R. R., PONCE, C. C., CLIQUET, M., SANTOS, M. T., GUERRA-SHINOHARA, E. M.
Elevated mRNA Expression of FGF2 and TGFB1 Genes in Myelofibrosis and Essential Thrombocythemia Patients In: 56th ASH Annual Meeting & Exposition, 2014, San Francisco, California.
Blood. American Society of Hematology, 2014. v.124. p.5179 - 5179

5. Luciene Terezina de Lima, **DANIELA P. T. Nunes**, Gomes, GW, Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille, Silva, M. R. R., PONCE, C. C., Castro, FA de, GUERRA-SHINOHARA, E. M.
Gene expression and protein levels of MMPS, TIMPS and SPARC and their relationship with plasma markers of angiogenesis in myelofibrosis and essential thrombocythemia patients In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milan.
Haematologica. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v.99. p.662 - 662

6. Luciene Terezina de Lima, **NUNES, D. P. T.**, Gomes, GW, Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille, Silva, M. R. R., César Cilento Ponce, Castro, FA de, SANTOS, M. T., ELVIRA MARIA GUERRA-SHINOHARA
Higher MMP9 and FGF2 Protein Levels and Elevated MMP9/TIMP Ratios Were Associated with JAK2V617F Mutation Regardless of Allele Burden in Myelofibrosis In: 56th ASH Annual Meeting & Exposition, 2014, San Francisco, California.
Blood. American Society of Hematology, 2014. v.124. p.5192 -

7. Gomes, GW, Luciene Terezina de Lima, **DANIELA P. T. Nunes**, RODRIGUES, A. C., Castro, FA de, TOGNON- RIBEIRO, R., GUERRA-SHINOHARA, E. M.
JAK-STAT pathway inhibitor do not modulate drug transporters gene expressions in JAK2V617F positive cell lines In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milan.
Haematologica. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v.99. p.661 - 662

8. **DANIELA P. T. Nunes**, Luciene Terezina de Lima, Gomes, GW, YASSUI, C. G., CHAUFFAILLE, M. L. L. F., Silva, M. R. R., PONCE, C. C., Castro, FA de, GUERRA-SHINOHARA, E. M.
TGF-B signaling pathway molecular regulation by SMADs in myelofibrosis patients In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão.
Haematologica - The hematology journal. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v.99. p.660 - 661

9. **NUNES, Daniela Prudente Teixeira**, Luciene Terezina de Lima, SANTOS, L. C., PONCE, C. C., GUERRA-SHINOHARA, E. M., Silva, M. R. R., CHAUFFAILLE, M. L. L. F.
Angiogenesis assessment in primary myelofibrosis and polycythemia vera patients In: Hemo 2013 - Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2013, Brasília.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo: Rs Press, 2013. v.35. p.193 - 193

10. ANTONIO HÉLIO Oliani, DENISE CRISTINA M. V. Oliani, LIGIA C. J. F. Spegiorin, ELOÍSA A. Galão, **DANIELA PT NUNES**, LUIZ CARLOS de Mattos
Alelos ADA*01 e ADA*02 do gene Adenosina Deaminase (ADA) em mulheres com e sem histórico de aborto espontâneo recorrente In: XII ECIF - Encontro Científico da FAMERP e VI CAIC - Congresso Anual de Iniciação Científica, 2009, São José do Rio Preto - SP.
Arquivos de Ciências da Saúde. São José do Rio Preto -SP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2009. v.16. p.R-059 - R-059

11. NUNES, D. P. T., SPEGIORIN, L. C. J. F., FERREIRA, A.I. DA C., BRANDÃO DE MATTOS, C. C., Galão, Eloísa A., VAZ, D. C. M., OLIANI, A. H., MATTOS, L. C.
Associação entre as incompatibilidades pelo sistema histo-sangüíneo ABO e o aborto espontâneo recorrente In: XII ECIF - Encontro Científico da FAMERP e VI CAIC - Congresso Anual de Iniciação Científica da FAMERP, 2009, São José do Rio Preto.
Arquivos de Cências da Saúde. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2009. v.16. p.R-234 - R-234

12. GALBIATTI, A.L., VIANA, A. R. A., NAKASHIMA, F, **NUNES, D. P. T.**, PEREIRA JUNIOR, E.J., FERREIRA, A.I.C., MATTOS, C. C. B., MATTOS, L. C.
Discordância entre os fenótipos eritrocitários do sistema Lewis (ISBT 007) e o status secretor definido pela genotipagem FUT2 In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador-SA.
Anais do 54 Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p.104 - 104

13. NUNES, D. P. T., Barril, N
Integração entre as aulas do estágio supervisionado de um curso de biomedicina e um projeto de ação social In: Anais do XI ECIF - IV CAIC, 2007, São José do Rio Preto.
Arquivos de Ciências da Saúde. , 2007. v.14. p.89 - 89

Apresentação de trabalho e palestra

1. Lima, Luciene T, **NUNES, D. P. T.**, Gomes, GW, CHAUFFAILLE, M. L., Silva, M. R. R., PONCE, C. C., Castro, FA de, CLIQUET, M., dos Santos, Marcos T, Miguel Mitne Neto, GUERRA-SHINOHARA, E. M.
Serum levels of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors are elevated in JAK2V617F mutated compared to CALR mutated myelofibrosis and triple negative essential thrombocythemia patients, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. Luciene Terezina de Lima, **NUNES, Daniela PT**, Gomes, GW, Chauffaille, Maria de L, Silva, M. R. R., PONCE, C. C., Castro, FA de, CLIQUET, M., SANTOS, M. T., Miguel Mitne Neto, GUERRA-SHINOHARA, E. M.
Serum levels of matrix metalloproteinases and their tssue inhibitors are decreased in CALR mutated myelofibrosis and triple negative essential thrombocythemia patients, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)

3. **DANIELA PT NUNES**, JULIANO FELIX BERTINATO, MÁRIO HENRIQUE BURLACCHINI DE CARVALHO, ANTONIO AMORIM FILHO, MARCELO ZUGAIB, ELVIRA MARIA GUERRA-

SHINOHARA
POLYMORPHISMS IN ANTITHROMBIN AND PROTEIN C GENES AND THEIR ASSOCIATION WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS, 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho)

4. **DANIELA PT NUNES**, LIGIA C. J. F. Spegiorin, CINARA C. C. Brandão de Mattos, ANTONIO HÉLIO Oliani, DENISE CRISTINA M. V. Oliani, LUIZ CARLOS de Mattos
Abortamento espontâneo recorrente: não associação com polimorfismo G22A do gene ADA, 2010. (Outra,Apresentação de Trabalho)

5. ANTONIO HÉLIO Oliani, **DANIELA PT NUNES**, LIGIA C. J. F. Spegiorin, Cinara C Brandão de Mattos, Denise CMVaz Oliani, Luiz C de Mattos
Alelo ADA*02 do gene ADA (20q13.11) e abortamento espontâneo recorrente: ausência de associação, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

6. NUNES, D. P. T., OLIANI, A. H., OLIANI, D. C. M. V., SPEGIORIN, L. C. J. F., BRANDÃO DE MATTOS, C. C., MATTOS, L. C.
Ausência de Associação entre aborto espontâneo recorrente e polimorfismo TaqI do gene ADA, 2010. (Outra,Apresentação de Trabalho)

7. **DANIELA PT NUNES**, Luís Valério Filho
Palestra: Citogenética Humana e suas aplicações, 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

8. **DANIELA PT NUNES**, Luís Valério Filho
Palestra: DNA: Extração e Aplicações, 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

9. FERREIRA, A.I. DA C., CINARA C. C. Brandão de Mattos, FÁBIO B. FREDERICO, GILDÁSIO C Almeida Júnior, NAKASHIMA, F, NUNES, D. P. T., CRISTINA S Meira, VERA L Pereira-Chioccola, LUIZ CARLOS de Mattos
Prevalência de anticorpos IgG anti-Toxoplasma gondii em pacientes atendidos em ambulatório de oftalmologia da região noroeste do estado de Sâo Paulo, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

10. OLIANI, A. H., OLIANI, Denise C. V., SPEGIORIN, L. C. J. F., Galão, Eloísa A., NUNES, D. P. T., MATTOS, L. C.
Alelos ADA*1 e ADA*2 do gene Adenosina Deaminase (ADA) em mulheres com e sem histórico de aborto espontâneo recorrente, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

11. NUNES, D. P. T., SPEGIORIN, L. C. J. F., Galão, Eloísa A., OLIANI, Denise C. V., OLIANI, A. H., MATTOS, L. C.
Associação entre as incompatibilidades pelo sistema histo-sanguíneo ABO e o aborto espontâneo recorrente, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

12. GALBIATTI, A.L., VIANA, A. R. A., NAKASHIMA, F, NUNES, D. P. T., PEREIRA JUNIOR, E.J., FERREIRA, A.I.C., MATTOS, C. C. B., MATTOS, L. C.
Discordância entre os fenótipos eritrocitários do sistema Lewis (ISTB 007) e o Status Secretor definido pela genotipagem FUT2, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

13. VIANA, A. R. A., FERREIRA, A.I. DA C., NAKASHIMA, F, NUNES, D. P. T., PEREIRA JUNIOR, E.J., MATTOS, C. C. B., GALBIATTI, A.L., MATTOS, L. C.
Genotipagem FUT2 e fenotipagem eritrocitária Lewis: Índices de concordância, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

14. NUNES, D. P. T., Barril, N
Integração entre as aulas do estágio supervisionado de um curso de biomedicina e um projeto de ação social., 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

15. NUNES, D. P. T., Barril, N
O estágio supervisionado como projeto de ação social, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Educação e Popularização de C&T
Organização de eventos, congressos, exposições e feiras e olimpíadas

1. **NUNES, D. P. T.**
V Simpósio da Pós-Graduação em Análises Clínicas, 2013. (Outro, Organização de evento)

Eventos

Eventos
Participação em eventos

1. **56th ASH Annual Meeting & Exposition**, 2014. (Encontro)

2. **IV Seminários avançados em tecnologia de microarrays e next generation sequencing**, 2013. (Seminário)

3. **IV Simpósio Internacional de Citometria de Fluxo**, 2012. (Simpósio)

4. **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2012. (Congresso)

5. **IV Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas -SIMPAC**, 2012. (Simpósio)

6. **Semana de Inovações Biológicas e Biotecnológicas Aplicadas à Saúde**, 2012. (Simpósio)

7. **III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2011. (Simpósio)

8. **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2011. (Congresso)

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IX Workshop da Pós-Graduação e X Workshop de Genética**, 2010. (Oficina)
Abortamento espontâneo recorrente: não associação com polimorfismo G22A do gene ADA.

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV Jornada de Obstetrícia e Ginecologia da SOGESP**, 2010. (Outra)
Ausência de Associação entre aborto espontâneo recorrente e polimorfismo TaqI do gene ADA.

11. Simposista no(a) **VI Ciclo de Atualização Farmacêutica**, 2010. (Simpósio)
Citogenética Humana e suas aplicações.

12. Simposista no(a) **VII Jornada de Biomedicina**, 2010. (Simpósio)
DNA: Extração e Aplicações.

13. **Simpósio Anual de Hematologia**, 2010. (Simpósio)

14. **III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2010. (Simpósio)

15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XII ECIF - Encontro Científico da FAMERP & VI CAIC - Congresso Anual de Iniciação Científica**, 2009. (Congresso)
Alelos ADA*1 e ADA*2 do gene Adenosina Deaminase (ADA) em mulheres com e sem histórico de aborto espontâneo recorrente.

16. Simposiasta no(a) **VII Simpósio de Biomedicina**, 2009. (Simpósio)
Campo de trabalho do biomédico.

17. **VII Simpósio de Reprodução Humana**, 2009. (Simpósio)

18. **XII Simpósio de Genética**, 2009. (Simpósio)

19. **XXIV Semana da Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Clências Exatas, IBILCE - UNESP**, 2008. (Outra)

20. **VIII Workshop de Genética - UNESP de Botucatu**, 2008. (Outra)

21. **XI Simpósio de Genética e I Simpósio IMC-IBILCE**, 2008. (Simpósio)

22. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XI ECIF - Encontro Científico da Famerp & IV CAIC - Congresso Anual de Iniciação Científica**, 2007. (Congresso)
INTEGRAÇÃO ENTRE AS AULAS DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO DE UM CURSO DE BIOMEDICINA E UM PROJETO DE AÇÃO SOCIAL.

23. **Semana de Palestras Biomédicas**, 2007. (Outra)

24. **I Simpósio de Microbiologia do IBILCE/UNESP**, 2007. (Simpósio)

25. **34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**, 2007. (Congresso)

26. Apresentação (Outras Formas) no(a)**Manhã Comunitária – Unifev**, 2006. (Oficina)
Dosagens de glicose.

27. **XI Simpósio de Análises Clínicas de São José do Rio Preto**, 2006. (Simpósio)

28. **X Simpósio de Análises Clínicas de São José do Rio Preto**, 2005. (Simpósio)

29. **I Simpósio de Biotecnologia do Noroeste Paulista**, 2005. (Simpósio)

30. **III Simpósio de Biomedicina**, 2005. (Simpósio)

31. Apresentação (Outras Formas) no(a)**III Feira de Informação Profissional**, 2004. (Outra)
Apresentação do curso de Biomedicina.

32. **II Simpósio de Biomedicina**, 2004. (Simpósio)

33. **7º Encontro Regional de Biomedicina do Instituto de Biociências de Botucatu**, 2004. (Encontro)

Organização de evento

1. **NUNES, D. P. T.**
V Simpósio da Pós-Graduação em Análises Clínicas, 2013. (Outro, Organização de evento)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	3
Trabalhos publicados em anais de eventos	13
Apresentações de trabalhos (Congresso)	9
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	2
Apresentações de trabalhos	

(Outra)..... 4

Eventos

Participações em eventos
(congresso)..... 5
Participações em eventos
(seminário)..... 1
Participações em eventos
(simpósio)..... 18
Participações em eventos
(oficina)..... 2
Participações em eventos
(encontro)..... 2
Participações em eventos
(outra)..... 5
Organização de evento
(outro)..... 1

ANEXO G - Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7907633/1 - Daniela Prudente Teixeira Nunes

Email:	danielanunes@usp.br
Data de Nascimento:	20/05/1986
Cédula de Identidade:	RG - 43.551.476-3 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário de Votuporanga - Fundação Educacional de Votuporanga - São Paulo - Brasil - 2007
Mestrado:	Mestre em Ciências da Saúde (1) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - São Paulo - Brasil - 2010

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	01/02/2012
Início da Contagem de Prazo:	01/02/2012
Data Limite para o Depósito:	01/02/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara - 01/02/2012 até o presente. Email: emguerra@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 01/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 29/11/2013
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 01/02/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 02/02/2015

Impresso em: 28/05/2015 15:30:58

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7907633/1 - Daniela Prudente Teixeira Nunes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-10/2	Tópicos em Análises Clínicas I	06/03/2012	26/06/2012	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5102-2/8	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/03/2012	25/04/2012	60	4	80	A	N	Concluída
FBC5723-5/1	Mecanismos das Interações Patológicas entre Células Endoteliais, Elementos Circulantes e sua Importância em Processos Vaso-Oclusivos	11/06/2012	01/07/2012	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5771-7/1	Bioinformática Aplicada às Análises Clínicas	10/07/2012	23/07/2012	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5709-5/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	13/08/2012	16/09/2012	75	5	93	A	N	Concluída
FBC5736-2/2	Alterações Bioquímicas e Moleculares nas Anemias	14/08/2012	18/09/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/1	Tópicos em Análises Clínicas II	14/08/2012	26/11/2012	15	1	85	A	N	Concluída
MPT5793-1/2	Citogenômica I (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	19/09/2012	13/11/2012	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
IBI5030-1/1	Curso Avançado de Sinalização Celular e Redes de Modulação Gênica (Curso Interunidades: Bioinformática - Universidade de São Paulo)	22/11/2012	12/12/2012	45	3	87	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	24
Estágios:			
Total:	0	20	24

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto no Parecer nº 930/98, de 30.12.1998 da Câmara de Ensino Superior do CNE..

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 02/02/2015
Impresso em: 28/05/2015 15:30:58

ANEXO H – Artigo publicado no periódico *Blood Cells, Molecules and Diseases*

Blood Cells, Molecules and Diseases 55 (2015) 236–240

Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

CALR mutations screening in wild type *JAK2*^{V617F} and *MPL*$^{W515K/L}$ Brazilian myeloproliferative neoplasm patients

Daniela Prudente Teixeira Nunes [a,1], Luciene Terezina de Lima [a,1], Maria de Lourdes Chauffaille [b], Miguel Mitne-Neto [c], Marcos Tadeu dos Santos [c], Marcelo Gil Cliquet [d], Elvira Maria Guerra-Shinohara [a,*]

[a] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
[b] Departamento de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil
[c] Grupo Fleury, Pesquisa e Desenvolvimento, São Paulo, Brazil
[d] Departamento de Hematologia, Complexo Hospitalar de Sorocaba, Universidade Católica de São Paulo, Sorocaba, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Submitted 5 March 2015
Revised 7 July 2015
Accepted 8 July 2015
Available online 9 July 2015

Keywords:
CALR
Myeloproliferative neoplasms
Myelofibrosis
Essential thrombocythemia
JAK2^{V617F}

ABSTRACT

Some myeloproliferative neoplasm (MPN) patients harbor *JAK2*^{V617F} mutation, and *CALR* mutations were recently discovered in wild type (WT) *JAK2*^{V617F}. We evaluated the frequency and type of *CALR* mutations, and clinical and hematological characteristics in WT *JAK2*^{V617F} and *MPL*$^{W515K/L}$ MPN patients. Sixty-five patients were included: 21 with primary myelofibrosis (PMF), 21 with myelofibrosis post-essential thrombocythemia (MPET) and 23 with essential thrombocythemia (ET). Screening for *JAK2*^{V617F} and *MPL*$^{W515K/L}$ were performed using real-time PCR, while *CALR* mutations were analyzed by fragment analysis and Sanger sequencing. *JAK2*^{V617F} was the most frequent mutation (54.5%) and one patient (1.5%) harbored *MPL*^{W515L}. *CALR* mutations were present in 38.1% of PMF, 12.5% of ET and 33.3% of MPET patients. Five types of *CALR* mutations were detected, among which type 1 (32.1%) and type 2 (21.4%) were found to be the most common. A novel *CALR* mutation in a PMF patient was found. Patients carrying *CALR* mutations had higher platelet count and less presence of splenomegaly than *JAK2*^{V617F}, while triple negatives had higher C-reactive protein levels than *CALR* mutant carriers. Screening for *CALR* mutations and its correlation with clinical features could be useful for the characterization of MPN patients and result in its incorporation into a new prognostic score.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal hematopoietic disorders characterized by aberrant expansion of one or more myeloid lineages. The most common Philadelphia-negative MPNs are primary myelofibrosis (PMF), essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV) [1].

The identification of a single base substitution in *JAK2*, the gene encoding the protein janus kinase 2, provided the first molecular biomarker of these MPN. *JAK2*^{V617F} mutation was found in 95% of patients with PV and in 60% to 65% of those with PMF and ET [2–5]. The remaining 5% of patients with PV carry a somatic mutation of *JAK2* exon 12 [6,7]. Subsequent studies showed that somatic mutations of *MPL* exon 10, mainly involving codon W515, are found in about 5% of PMF and ET patients [8–10]. Additional mutations were also identified in MPN patients but they affect only a small minority.

Recently, two studies identified mutations in *CALR* exon 9 gene in the 70 to 84% of wild type (WT) *JAK2*^{V617F} and *MPL*$^{W515K/L}$ PMF and ET patients providing strong genetic evidence that *CALR* mutations have an important role in the pathogenesis of these disorders [11,12]. These mutations are insertions or deletions leading to a frameshift responsible for modifying the C-terminal part of the calreticulin protein. The last four amino acids of calreticulin (KDEL), which contain the endoplasmic reticulum-retention signal, becomes positively charged and the reticulum targeting KDEL sequence is abrogated, which disturbs its cellular localization [11].

The frequency of *CALR* mutations is about 20% to 25% of all patients with PMF and ET [11,12]. To date, more than 50 different types of mutations in *CALR* have been detected, but type 1 variant (p.L367fs*46) resulting from 52 bp deletion and type 2 variant (p.K385fs*47) resulting from 5 bp TTGTC insertion are the most frequent types, overall being found in more than 80% of all patients with mutant *CALR* [13].

Since *CALR* mutations discovery, several studies have correlated these mutations with clinical data and patient outcome in MPNs [14–24]. Interestingly, the presence of *CALR* mutation in peripheral granulocytes of two PV patients negative for both *JAK2*^{V617F} and *JAK2*^{exon12} mutations [25] was described. The coexistence of *JAK2*^{V617F} and *CALR* mutations have been found in rare cases of refractory

* Corresponding author at: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, AV. Professor Lineu Prestes, 580, CEP: 05508-000 São Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: emguerra@usp.br (E.M. Guerra-Shinohara).
[1] Both authors contributed equally.

http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.07.005
1079-9796/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis [26], PMF [16,27], ET [28–30] and PV [30].

The identification and evaluation of disease-specific mutations could be valuable for diagnosis, prognosis and monitoring of treatment response. In the present study the frequency and types of *CALR* mutations were described, and hematological and clinical features of *JAK2*^{V617F} patients were compared with those carrying *CALR* mutations and triple negatives.

2. Patients and methods

2.1. Patients and study design

This study enrolled 65 MPN patients, consisting of 21 PMF and 23 ET diagnosed according to World Health Organization (WHO) criteria (2008) [31]. Other 21 myelofibrosis post-essential thrombocythemia (MPET) patients were diagnosed according to the International Working Group for MPN Research and Treatment [32]. Patients were selected from the Discipline of Hematology and Hemotherapy from the Universidade Federal de São Paulo and from the Hematology Division of the Universidade Católica de São Paulo, Brazil. Clinical and laboratory parameters were obtained at the time of the first diagnosis or when peripheral blood for genomic DNA samples was collected. Hematological analysis was conducted by Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, CA, USA) and C-reactive protein levels were determined by ultrasensitive immunoturbidimetry. Genomic DNA samples were tested at the Fleury Group Center, in a laboratory certified according to the provisions of the College of American Pathologists (CAP), ISO-9001, ISO-14001 and the Brazilian Clinical Laboratory Accreditation Program (PALC). This study was conducted in accordance with the guidelines of the Institutional Ethics Committee.

2.2. Detection of JAK2, MPL and CALR mutations

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a QIAamp Blood Mini Kit DNA extraction (PreAnalytix/Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.

Screening for *JAK2*^{V617F} (and allele burden) and *MPL*$^{W515K/L}$ mutations were performed using TaqMan-based real-time PCR method as previously described [33]. Only WT *JAK2*^{V617F} samples were analyzed for *MPL*$^{W515K/L}$ mutations. The ones without *MPL*$^{W515K/L}$ mutations were further analyzed for *CALR* mutations.

CALR exon 9 mutations were examined by fragment analysis using high resolution sizing of fluorescence-labeled PCR products. A PCR reaction was set up with a M13F (−21) sequence attached to the forward primer (TGTAAAACGACGGCCAGTCTGGCACCATCTTTGACAACTT) and a M13R (2) attached to the reverse primer (CAGGAAACAGCTATGACCGG CCTCTCTACAGCTCGTC), besides a M13F primer (TGTAAAACGACGGC CAGT) attached to a FAM fluorophore.

PCR reactions were prepared using 10 μL of PCR mix (2×) (Promega, Madison WI, USA), 0.15 μM of each primer, 5 μL of DNA template and water to a final reaction volume of 20 μL. The PCR cycling conditions were: an initial denaturation at 95 °C for 10 min; 40 cycles of denaturation at 96 °C for 30 s, annealing at 57 °C for 30 s, plus 20 cycles of annealing at 53 °C, extension at 72 °C for 30 s; and a final extension at 72 °C for 10 min. Fragment products were analyzed by capillary electrophoresis (Applied Biosystems 3500; Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) and evaluated by GeneMapper® ID-X Software Version 1.2 −) Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA. All the samples were further analyzed by Sanger sequencing. A PCR reaction was set up with the same forward and reverse primers described above. The PCR final volume and concentrations were the same as for the previous reaction, and the PCR cycling excluded the annealing temperature to 53 °C in the last 20 cycles. Mutations were identified using CLC Genomics Workbench (Qiagen, Aarhus, Denmark), and the secondary structure of the protein was predicted using EMBOSS Transeq (EMBL-EBI, UK) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) and JPRED [33].

2.3. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using SPSS version 17.0 (IBM, USA) and GraphPad Prism™ version 5.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) software. P-values of less than 0.05 were considered significant. Numerical variables have been summarized by their median and interquartile range and categorical variables by number of patients and percentage (%) of each category. Allele burden results were presented as the median of percentage of mutated alleles, and groups were compared by Kruskal–Wallis test. Mann–Whitney test was used for continuous variables, while for categorical variables Chi-square and Fisher's exact tests were used.

3. Results

Among the 65 studied patients, 36 (55.4%) presented *JAK2*^{V617F}, one (1.5%) *MPL*^{W515L}, and 18 (27.7%) *CALR* mutations. Ten patients (15.4%) were considered triple negative, as they lacked *JAK2*^{V617F}, *MPL*$^{W515K/L}$ or *CALR* mutations. The mutation frequencies in each studied group are described in Fig. 1.

The median of allele burden for *JAK2*^{V617F} was 25.5% in PMF, 9.0% in ET and 9.9% in MPET patients, and the differences were not significant ($p = 0.351$). Two *JAK2*^{V617F} positive patients also presented karyotype alterations, one PMF (46,XX, del(20)(q4q13)[2]/46,XX[15]) and one MPET patient (46,XY,del(20)(q11.2)[5]). Both of them had higher allele burden percentages than the median of their respective groups (79.7% and 70.8%, respectively).

Among 29 WT *JAK2*^{V617F} and *MPL*$^{W515K/L}$ patients, 18 (62.1%) presented *CALR* mutations: 80.0% (8/10) of those with PMF, 77.8% (7/9) of those with MPET, and 30.0% (3/10) of those with ET. The most frequent *CALR* mutation in all patients were type 1 (p.L367fs*46), followed by type 2 (p.K385fs*47). There were nine (32.1%) type 1 and six (21.4%) type 2 mutations, while the remaining included type 32 (p.K385fs*46) and type 40 (p.K375fd*49), as well as a novel mutation (*1125delA*). ET patients did not harbor type 2 mutation. The group distribution of *CARL* mutations are showed in Table 1.

All the samples showed concordance between fragment and sequencing analysis of *CALR* exon 9 mutations, except for the PMF patient harboring the novel mutation (*1125delA*). The misidentification of a single base deletion in the fragment analysis can be attributed to its technical limitation to recognize small insertions and deletions. This patient did not show any different clinical or hematological data than patients harboring type 1 or type 2 mutations ($p > 0.05$). This 61-year-old man had severe anemia (hemoglobin level, 5.8 g/dL), a leukocyte count of 4.200/mm^3 and platelet count of 133.000/mm^3. He did not present thrombotic events or diabetes, but he was hypertensive. The novel mutation *1125delA* leads to a frameshift that changes the secondary structure of the protein resulting in an alpha-helix conformation.

Clinical and hematological features of 64 patients stratified by their mutation profile (*CALR* mutated, *JAK2*^{V617F} and triple negative) are listed in Table 2. *MPL*^{W515L} positive patient was not included in these analyses. Patients carrying *CALR* mutations had higher platelet count ($p = 0.032$) and lower splenomegaly frequency ($p = 0.030$) than *JAK2*^{V617F}, while triple negative patients had higher body mass index than *JAK2*^{V617F} carriers ($p = 0.011$). Furthermore, triple negative patients also had higher C-reactive protein levels ($p = 0.011$) than patients carrying *CARL* mutations.

PMF *CALR* mutant carriers showed lower red blood cell count ($p = 0.048$), hemoglobin levels ($p = 0.021$), hematocrit ($p = 0.021$), C-reactive protein levels ($p = 0.035$) and less presence of splenomegaly ($p = 0.031$) than *JAK2*^{V617F} carriers. Furthermore, PMF *CALR* mutated patients showed lower frequency of thrombotic events ($p = 0.019$) in comparison with *JAK2*^{V617F} carriers, while C-reactive protein levels

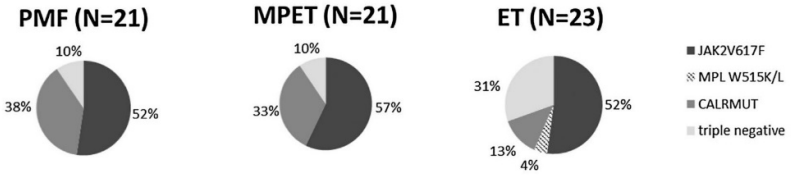

Fig. 1. Frequencies of *JAK*^{2V617F}, *MPL*$^{W515K/L}$ and CALR mutations in myeloproliferative neoplasms patients. PMF: primary myelofibrosis, MPET: myelofibrosis post-essential thrombocythemia, ET: essential thrombocythemia.

($p = 0.036$) and the presence of splenomegaly ($p = 0.009$) were higher in *CALR* WT compared with *CALR* mutation carriers. ET *CALR* mutant carriers had a higher platelet count ($p = 0.043$) than *JAK2*^{V617F}, and MPET *CALR* mutant carriers had a higher body mass index ($p = 0.042$) than *JAK2*^{V617F}.

4. Discussion

The discovery of the *JAK2*^{V617F} mutation in 2005 has clarified some of the molecular bases and has become major molecular diagnosis criteria for MPN [2–5]. The recent discovery of *CALR* mutations in MPN patients has given a new horizon for the diagnosis and treatment of these diseases [34,35] and may also have implications for risk stratification, management, and prognosis [14,19,36,37].

The frequency of *CALR* mutations in WT *JAK2*^{V617F} and *MPL*$^{W515K/L}$ Brazilian MPN patients was shown in the present study, being according to our knowledge, the first report regarding *CALR* mutations in Brazil. Clinical and hematological features of *JAK2*^{V617F} mutated patients were also compared with those of *CALR* mutant carriers and triple negatives.

CALR gene encodes calreticulin, a protein with several functions, located primarily in the lumen of the endoplasmic reticulum where it performs functions of chaperone. This protein has an important function in calcium homeostasis, acting as a major $Ca^{(2+)}$-binding (storage) protein, and it probably has a role in transcription regulation since it is also found in the cellular nucleus [38]. The target genes of calreticulin are still unknown; however, there is evidence for its involvement in apoptosis and cell survival regulation in cancer cells by promotion of macrophage antitumor activity [39]. Mutations in *CALR* gene result in a novel C-terminal peptide in a endoplasmic reticulum-retention region, and besides that the physiological effects of these alterations are not yet cleared, the first studies suggest a critical implication of STAT5 phosphorylation [11].

The high prevalence of *CALR* mutations in MPN and the fact that they are present in majority of *JAK2*^{V617F} negative patients corroborates that at least some of the *CALR* protein functions overlap with those of janus kinase 2 [13]. *CALR* has already proven to be useful for MPN diagnostics and has been recently put up as a candidate for the future WHO diagnostic criteria of MPNs [15,40].

JAK2^{V617} was the most frequent mutation in our cohort, showing similar frequencies as previously reported [2,5,31]. Furthermore, *CALR* mutations frequency in MPN patients in this study (27.37%) confirms previous findings in European patients (20–25%) [11,12,41]. These mutations were found in 74% [16] and 88% [11] of PMF WT *JAK2*^{V617F} patients, while in this study the reported frequency was 80%. Brazilian PMF patients showed higher frequencies of *CALR* mutations than Chinese [41,42] and Japanese [24] populations. Interestingly, *CALR* mutation frequencies in ET patients were similar to those reported in a Chinese study [42], but much lower than the frequencies reported by others [11,19,24,41]. It is noteworthy that the Brazilian population has a very diverse genetic background that is the result of more than five centuries of interethnic crossing of people from three continents: European, Amerindian and African [43–46]. Therefore, the discrepancy in *CALR* mutations frequencies among MPN patients in these studies could be explained by different ethnic backgrounds.

Patients carrying *CALR* mutations had higher platelet count than *JAK2*^{V617F}. However, when we evaluated each group of disease separately, only ET patients presented this feature. In fact, previous cohort studies showed that PMF and ET patients carrying *CALR* mutations have higher platelet count than *JAK2*^{V617F} [14,16,19]. They also showed that *CALR* mutant carriers have younger age and lower leucocyte count than *JAK2*^{V617F} counterparts. Although not statistically significant, we observed the same trend in accordance with these statements.

CALR mutations have been associated with better thrombosis-free survival in ET [11,14,18,47] and superior overall survival in PMF [16]. We found lower frequency of thrombotic events in *CALR* mutated PMF patients compared to the non-mutated ones. This result corroborates the aforementioned studies and suggests a better prognosis for patients with *CALR* mutations than *JAK2*^{V617F} carriers.

With regard to splenomegaly, our data are consistent with another study [19] that showed less presence of splenomegaly in ET patients carrying *CALR* mutations compared to *JAK2*^{V617F} patients. It was also showed that *CALR* mutation was associated with lower red blood cell count, hemoglobin and hematocrit in PMF patients, as previously reported [14,16,19,24]. In general, better overall survival in the *CALR* mutant carrier has been demonstrated in comparison to either *JAK2*^{V617F} or triple negative patients [16].

Table 1
CALR mutation distribution among primary myelofibrosis, myelofibrosis post-essential thrombocythemia and essential thrombocythemia patients.

Mutation	Mutation type	PMF (n = 10)	MPET (n = 9)	ET (n = 9)	Total
1092_1143del52	1	4 (40.0)	3 (33.4)	2 (22.2)	9 (32.1)
1154_1155insTTGTG	2	3 (30.0)	3 (33.4)	0	6 (21.4)
1153_1154AA>TGTC	32	0	1 (11.0)	0	1 (3.6)
1122_1140del19	40	0	0	1 (11.1)	1 (3.6)
1125delA[a]	Novel	1 (10.0)	0	0	1 (3.6)
Wild-type	None	2 (20.0)	2 (22.2)	6 (66.7)	10 (35.7)

[a] *1125delA* is a novel mutation. PMF: primary myelofibrosis, MPET: myelofibrosis post-essential thrombocythemia, ET: essential thrombocythemia. Data are presented as number of subjects (percentage).

Conclusions

These data supports the importance of *JAK2*^{V617F}, *MPL*$^{W515K/L}$ and *CALR* mutations profile screening in MPN patients. The identification of one of these molecular markers is very helpful to consolidate an accurate diagnosis of MPN and useful in the prognostic and management of MPN patients. Due to remarkable occurrence, increasingly studies have been performed and new *CALR* mutations have been described in different populations. In our study we found a new *CALR* mutation in a PMF patient with severe anemia at diagnosis. The question still remains: What is the role of *CALR* in the clinical outcome? More clinical and experimental studies are necessary to establish this relationship.

Table 2
Clinical and hematological features of myeloproliferative neoplasm patients according to gene mutation status.

Variables	All patients (n = 64)**	*CALR* mutated (A) (n = 18)	*JAK2*^{V617F} mutated (B) (n = 36)	Triple negative (C) (n = 10)	p value (A) vs (B)	p value (B) vs (C)	p value (A) vs (C)
Age (years)	64.5 (54.0–74.0)	61.0 (55.5–73.0)	66.5 (54.0–76.0)	59.5 (39.3–75.3)	0.714*	0.280*	0.401*
Males†	27 (42.2)	7 (38.9)	18 (50.0)	2 (20.0)	0.440£	0.150€	0.417€
RBC ($\times 10^9$/L)	4.0 (3.4–4.8)	4.1 (3.3–4.4)	4.1 (3.4–5.1)	3.8 (3.5–4.4)	0.353*	0.557*	0.924*
Hemoglobin (g/dL)	13.2 (11.8–15.0)	12.6 (11.3–14.0)	14.1 (12.2–15.7)	13.4 (11.4–14.9)	0.060*	0.682*	0.314*
Hematocrit (%)	38.8 (35.3–43.7)	36.5 (33.2–41.0)	41.7 (35.4–45.5)	39.4 (33.4–43.6)	0.079*	0.723*	0.250*
WBC ($\times 10^9$/L)	7.5 (5.7–10.6)	7.1 (5.1–8.3)	8.1 (6.0–13.4)	8.8 (4.8–9.5)	0.098*	0.503*	0.325*
Platelets ($\times 10^9$/L)	462 (304–680)	634 (401–811)	385 (270–599)	396 (238–671)	**0.032***	0.902*	0.093*
Body mass index (kg/m^2)	24.7 (22.5–27.3)	23.3 (20.6–29.0)	24.2 (22.5–26.0)	27.1 (24.8–31)	0.959*	**0.011***	0.084*
C-reactive protein (mg/dL)	0.17 (0.07–0.34)	0.08 (0.04–0.24)	0.17 (0.09–0.32)	0.43 (0.17–0.77)	0.125*	0.064	**0.011***
Presence of splenomegaly	14 (21.9)	1 (5.6)	10 (27.8)	3 (30.0)	**0.030**£	1.000€	0.130€
Weight loss	7 (10.9)	1 (5.6)	5 (13.9)	1 (10.0)	0.651£	1.000€	1.000€
Thrombotic event	6 (9.4)	1 (5.6)	4 (11.1)	1 (10.0)	0.651£	1.000€	1.000€
Hypertension	33 (51.6)	6 (33.3)	20 (55.6)	7 (70.0)	0.080£	0.716€	0.114€
Transfusion requiring	5 (7.8)	3 (16.7)	2 (5.6)	0	0.319€	1.000€	0.533€

**The patient positive for *MPL*^{W515L} was not included. RBC: red blood cell count, WBC: white blood cell count. Numeric variables are presented as median (P25–P75); (*) Mann–Whitney test was used for comparing groups (A × B; B × C and A × C). Categorical variables are presented as number of subjects (percentage); Chi-square (£) test or Fisher's exact test (€) was used to compare the frequencies between groups.
P-values with significant differences are shown in bold (P < 0.05).

Contributors

DPTN and LTL were responsible for the study design, recruitment of participants and data collection, analysis, and drafting, critical revision and final approval of the article.

MM-N and MTdS were responsible for the development of the methods for detection of *JAK2*^{V617F}, *MPLW*$^{515K/L}$ and *CALR* mutations, critical revision, and approval of the final report.

MdLC and MGC were part of the clinical team and were responsible for patient screening and recruitment, data collection, critical revision, and approval of the final report.

EMG-S was responsible for the study design, obtaining funding, coordination of the study, data analysis and critical revision, drafting and approval of the final report.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported financially by FAPESP, Brazil (2012/12957-5). DPTN, LTL and EMGS are recipients of fellowships from CNPq (DPTN: 141564/2012-1; LTL: 141542/2012-8 and EMGS: 311543/2014-6), Brazil. We thank all the patients who participated in this study.

References

[1] R.L. Levine, Another piece of the myeloproliferative neoplasms puzzle, N. Engl. J. Med. 369 (2013) 2451–2452.
[2] C. James, V. Ugo, J.P. Le Couédic, J. Staerk, F. Delhommeau, C. Lacout, L. Garçon, H. Raslova, R. Berger, A. Bennaceur-Griscelli, J.L. Villeval, S.N. Constantinescu, N. Casadevall, W. Vainchenker, A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera, Nature 434 (2005) 1144–1148.
[3] R. Kralovics, F. Passamonti, A.S. Buser, S.S. Teo, R. Tiedt, J.R. Passweg, A. Tichelli, M. Cazzola, R.C. Skoda, A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders, N. Engl. J. Med. 352 (2005) 1779–1790.
[4] R.L. Levine, M. Wadleigh, J. Cools, B.L. Ebert, G. Wernig, B.J. Huntly, T.J. Boggon, I. Wlodarska, J.J. Clark, S. Moore, J. Adelsperger, S. Koo, J.C. Lee, S. Gabriel, T. Mercher, A. D'Andrea, S. Fröhling, K. Döhner, P. Marynen, P. Vandenberghe, R.A. Mesa, A. Tefferi, J.D. Griffin, M.J. Eck, W.R. Sellers, M. Meyerson, T.R. Golub, S.J. Lee, D.G. Gilliland, Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis, Cancer Cell 7 (2005) 387–397.
[5] E.J. Baxter, L.M. Scott, P.J. Campbell, C. East, N. Fourouclas, S. Swanton, G.S. Vassiliou, A.J. Bench, E.M. Boyd, N. Curtin, M.A. Scott, W.N. Erber, A.R. Green, C.G. Project, Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders, Lancet 365 (2005) 1054–1061.
[6] L.M. Scott, W. Tong, R.L. Levine, M.A. Scott, P.A. Beer, M.R. Stratton, P.A. Futreal, W.N. Erber, M.F. McMullin, C.N. Harrison, A.J. Warren, D.G. Gilliland, H.F. Lodish, A.R. Green, JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis, N. Engl. J. Med. 356 (2007) 459–468.
[7] D. Pietra, S. Li, A. Brisci, F. Passamonti, E. Rumi, A. Theocharides, M. Ferrari, H. Gisslinger, R. Kralovics, L. Cremonesi, R. Skoda, M. Cazzola, Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders, Blood 111 (2008) 1686–1689.
[8] Y. Pikman, B.H. Lee, T. Mercher, E. McDowell, B.L. Ebert, M. Gozo, A. Cuker, G. Wernig, S. Moore, I. Galinsky, D.J. DeAngelo, J.J. Clark, S.J. Lee, T.R. Golub, M. Wadleigh, D.G. Gilliland, R.L. Levine, MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia, PLoS Med. 3 (2006) e270.
[9] A.D. Pardanani, R.L. Levine, T. Lasho, Y. Pikman, R.A. Mesa, M. Wadleigh, D.P. Steensma, M.A. Elliott, A.P. Wolanskyj, W.J. Hogan, R.F. McClure, M.R. Litzow, D.G. Gilliland, A. Tefferi, MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients, Blood 108 (2006) 3472–3476.
[10] P.A. Beer, P.J. Campbell, L.M. Scott, A.J. Bench, W.N. Erber, D. Bareford, B.S. Wilkins, J.T. Reilly, H.C. Hasselbalch, R. Bowman, K. Wheatley, G. Buck, C.N. Harrison, A.R. Green, MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort, Blood 112 (2008) 141–149.
[11] T. Klampfl, H. Gisslinger, A.S. Harutyunyan, H. Nivarthi, E. Rumi, J.D. Milosevic, N.C. Them, T. Berg, B. Gisslinger, D. Pietra, D. Chen, G.I. Vladimer, K. Bagienski, C. Milanesi, I.C. Casetti, E. Sant'Antonio, V. Ferretti, C. Elena, F. Schischlik, C. Cleary, M. Six, M. Schalling, A. Schönegger, C. Bock, L. Malcovati, C. Pascutto, G. Superti-Furga, M. Cazzola, R. Kralovics, Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms, N. Engl. J. Med. 369 (2013) 2379–2390.
[12] J. Nangalia, C.E. Massie, E.J. Baxter, F.L. Nice, G. Gundem, D.C. Wedge, E. Avezov, J. Li, K. Kollmann, D.G. Kent, A. Aziz, A.L. Godfrey, J. Hinton, I. Martincorena, P. Van Loo, A.V. Jones, P. Guglielmelli, P. Tarpey, H.P. Harding, J.D. Fitzpatrick, C.T. Goudie, C.A. Ortmann, S.J. Loughran, K. Raine, D.R. Jones, A.P. Butler, J.W. Teague, S. O'Meara, S. McLaren, M. Bianchi, Y. Silber, D. Dimitropoulou, D. Bloxham, L. Mudie, M. Maddison, B. Robinson, C. Keohane, C. Maclean, K. Hill, K. Orchard, S. Tauro, M.Q. Du, M. Greaves, D. Bowen, B.J. Huntly, C.N. Harrison, N.C. Cross, D. Ron, A.M. Vannucchi, E. Papaemmanuil, P.J. Campbell, A.R. Green, Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2, N. Engl. J. Med. 369 (2013) 2391–2405.
[13] M. Cazzola, R. Kralovics, From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms, Blood 123 (2014) 3714–3719.
[14] G. Rotunno, C. Mannarelli, P. Guglielmelli, A. Pacilli, A. Pancrazzi, L. Pieri, T. Fanelli, A. Bosi, A.M. Vannucchi, A.I.p.I.R.s.C.G.I.M.M. Investigators, Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia, Blood 123 (2014) 1552–1555.
[15] A. Tefferi, P. Guglielmelli, T.L. Lasho, G. Rotunno, C. Finke, C. Mannarelli, A.A. Belachew, A. Pancrazzi, E.A. Wassie, R.P. Ketterling, C.A. Hanson, A. Pardanani, A.M. Vannucchi, CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients, Leukemia 28 (2014) 1494–1500.
[16] A. Tefferi, T.L. Lasho, C.M. Finke, R.A. Knudson, R. Ketterling, C.H. Hanson, M. Maffioli, D. Caramazza, F. Passamonti, A. Pardanani, CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons, Leukemia 28 (2014) 1472–1477.
[17] A. Tefferi, E.A. Wassie, T.L. Lasho, C. Finke, A.A. Belachew, R.P. Ketterling, C.A. Hanson, A. Pardanani, N. Gangat, A.P. Wolanskyj, Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia, Leukemia 28 (2014) 2300–2303.
[18] E. Rumi, D. Pietra, C. Pascutto, P. Guglielmelli, A. Martínez-Trillos, I. Casetti, D. Colomer, L. Pieri, M. Pratcorona, G. Rotunno, E. Sant'Antonio, M. Bellini, C. Cavalloni, C. Mannarelli, C. Milanesi, E. Boveri, V. Ferretti, C. Astori, V. Rosti, F. Cervantes, G. Barosi, A.M. Vannucchi, M. Cazzola, A.I.p.I.R.s.C.G.I.M.M. Investigators, Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis, Blood 124 (2014) 1062–1069.