

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão das moléculas da via Hippo em neoplasias mieloproliferativas

Maira da Costa Cacemiro

Ribeirão Preto  
2018

## Expressão das moléculas da via Hippo em neoplasias mieloproliferativas

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientanda: Maira da Costa Cacemiro

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

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

Ribeirão Preto  
2018

## Resumo

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

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

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

## Abstract

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

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

**Keywords:** Myeloproliferative Neoplasms; via Hippo; apoptosis; cytokines

## Resumen

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

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) son enfermedades hematológicas caracterizadas por la proliferación creciente y la acumulación de células mieloides maduras de una o más series hematopoyéticas: granulocítica, eritrocítica, megacariocítica o mastocítica. Los pacientes con NMP pueden presentar mutaciones como la *JAK2V617F*, *MPL* y *CALR*, cuyas descripciones fueron fundamentales para el inicio de la elucidación fisiopatología de las NMP. Las células neoplásicas de las NMP presentan resistencia a la apoptosis y proliferación celular exacerbada. Se sabe que estas enfermedades se consideran oncoinflamatorias y pre-leucémicas. A pesar de todos estos conocimientos sobre los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la patogénesis de las NMP, no hay hasta la fecha tratamientos eficaces que curan o alteran la historia natural de progresión de esos desórdenes hacia LMA. Por lo expuesto, se investigó la potencial participación de los miembros de la vía de señalización Hippo en la fisiopatología de las NMP *BCR-ABL1* negativas más frecuentes, la policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MF). La vía de señalización Hippo fue descrita como supresora de tumor y es una de las responsables por la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular. En este estudio se analizó la correlación de los niveles de expresión de los genes de la vía Hippo con el perfil de citocinas plasmáticas de los pacientes con PV, TE y MF, la asociación con el "status mutacional" y con la expresión de los genes que regulan la apoptosis celular por la vía intrínseca. Los principales hallazgos en los pacientes con PV fueron la disminución de la expresión de los genes supresores de tumor *LATS2*, *MST1* y *MST2* acompañada por la presencia de elevada concentración de citocinas pro-inflamatorias y fenotipo de resistencia a la apoptosis. En la TE, los datos relevantes fueron la detección de la disminución de la expresión de los genes supresores de tumor *LATS1*, *LATS2*, *MST1* y *SAVI*, y la observación de la relación entre alta expresión de los genes *SAVI* y *MOB1B* y la mutación de la *CALR*. En MF se destaca la reducción de la expresión de los genes *SAVI* y *TAZ* de la vía de señalización Hippo y del gen *AURKB* del ciclo celular. En conclusión, los datos indican que la disminución de la expresión de los genes supresores de tumor de la vía Hippo contribuye a la fisiopatología y al fenotipo de resistencia de las células neoplásicas a la apoptosis de las NMP.

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

# *1. Introdução*

## 1.1. Neoplasias Mieloproliferativas: Características gerais, epidemiologia e diagnóstico

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **1.3. Neoplasias Mieloproliferativas e Inflamação**

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

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

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

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

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

#### **1.4.Via de sinalização Hippo**

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

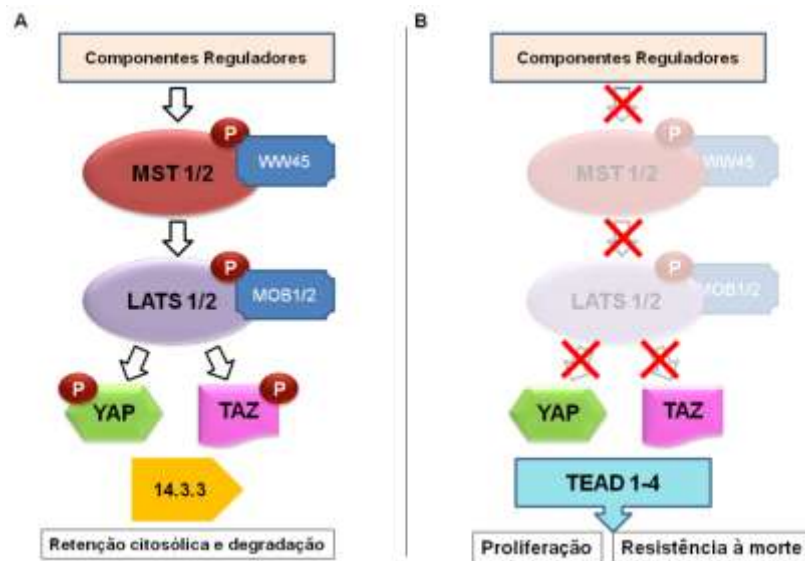
Essa via de sinalização é composta por três partes interligadas: os componentes regulatórios, os componentes da cascata de sinalização, incluindo proteínas quinase e adaptadoras, e finalmente, a maquinaria de transcrição (HONG; GUAN, 2012).

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

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



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



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

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

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

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

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

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

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

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

No mieloma múltiplo (MM) e nas leucemias (leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia mieloide aguda e leucemia linfoblástica aguda de células T), o YAP exerce função supressora do tumor regulando a resposta ao dano dependente do *Abl1* e induzindo apoptose nas células tumorais, assim sendo a regulação negativa de YAP/TAZ é frequentemente observada em MM e leucemias (COTTINI et al., 2014).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4.2. Via Hippo e apoptose**

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

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

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

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

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

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

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

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

## *9. Conclusão*

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

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





## *10. Referências Bibliográficas*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LUIZA-SILVA, M. et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 873–883, 15 set. 2011.

MACHADO-NETO, J. A. et al. YAP1 expression in myelodysplastic syndromes and acute leukemias. **Leukemia & Lymphoma**, v. 55, n. 10, p. 2413–2415, out. 2014.

MARSOLA, A. P. Z. C. et al. Expression of Hippo signaling pathway and Aurora kinase genes in chronic myeloid leukemia. **Medical Oncology**, v. 35, n. 3, mar. 2018.

MASSARO, P. et al. Polycythemia vera treated with recombinant interferon-alpha 2a: evidence of a selective effect on the malignant clone. **American Journal of Hematology**, v. 56, n. 2, p. 126–128, out. 1997.

MCPHERSON, J. P. et al. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. **The EMBO journal**, v. 23, n. 18, p. 3677–3688, 15 set. 2004.

MESA, R. A. et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). **Leukemia Research**, v. 31, n. 6, p. 737–740, jun. 2007.

MIRZA, A. M.; EZZAT, S.; AXELRAD, A. A. Insulin-like growth factor binding protein-1 is elevated in patients with polycythemia vera and stimulates erythroid burst formation in vitro. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1862–1869, 15 mar. 1997.

MITRA, D. et al. Symptom burden and splenomegaly in patients with myelofibrosis in the United States: a retrospective medical record review. **Cancer Medicine**, v. 2, n. 6, p. 889–898, dez. 2013.

MOROISHI, T. et al. A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. **Genes & Development**, v. 29, n. 12, p. 1271–1284, 15 jun. 2015.

MOULARD, O. et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. **European Journal of Haematology**, v. 92, n. 4, p. 289–297, abr. 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- YANG, J. et al. CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> acute myelogenous leukemia cells aberrantly express Aurora kinase A. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 11, p. 2706–2719, 1 dez. 2013.
- YANG, Q.; CRISPINO, J. D.; WEN, Q. J. Kinase signaling and targeted therapy for primary myelofibrosis. **Experimental Hematology**, v. 48, p. 32–38, 2017.
- YARBRO, J. W. Mechanism of action of hydroxyurea. **Seminars in Oncology**, v. 19, n. 3 Suppl 9, p. 1–10, jun. 1992.
- YE, D. et al. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Journal of Hematopathology**, v. 2, n. 1, p. 2–8, mar. 2009.
- YUAN, M. et al. Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 11, p. 1752–1759, nov. 2008.
- ZHAO, B. et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. **Genes & Development**, v. 22, n. 14, p. 1962–1971, 15 jul. 2008.
- ZHAO, D. et al. TAZ antagonizes the WWP1-mediated KLF5 degradation and promotes breast cell proliferation and tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 1, p. 59–67, jan. 2012.
- ZHOU, D. et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. **Cancer Cell**, v. 16, n. 5, p. 425–438, 6 nov. 2009.
- ZHOU, H. et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 189–193, out. 1998.
- ZHOU, X.; LI, W.; WANG, H. The roles and mechanisms of MST1/2 in the innate immune response. **Yi Chuan = Hereditas**, v. 39, n. 7, p. 642–649, 20 2017.