

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Juçara Gastaldi Cominal

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Orientada: Juçara Gastaldi Cominal

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de
Castro

Coorientadora: Profa. Dra. Kelen Cristina
Ribeiro Malmegrim de Farias

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

Ribeirão Preto

2019

RESUMO

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

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

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

1. Introdução



1.1 Neoplasias mieloproliferativas: Classificação, Diagnóstico e Tratamento

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

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

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

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

A policitemia vera é a mais comum das três doenças categorizadas como NMP Philadelphia negativo clássicas. Sua principal característica é a expansão clonal do progenitor eritroide, e que pode ou não estar acompanhada de leucocitose e/ou trombocitose (TEFFERI; BARBUI, 2017). Seu diagnóstico baseia-se na avaliação de três critérios: (i) aumento da massa eritrocitária (hemoglobina >16,5g/dL para homens e >16g/dL para mulheres; OU hematócrito >49% em homens e >48% em mulheres; OU contagem de eritrócitos >25% do valor de referência); (ii) análise da biópsia de MO constatando-se hipercelularidade panmielocítica para idade; (iii) presença da mutação no gene *JAK2* (exon 14 ou 12). Na ausência de um dos critérios citados, a constatação de eritropoetina em níveis subnormais no soro substitui um dos critérios e permite a confirmação do diagnóstico (ARBER et al., 2016).

A trombocitemia essencial (TE) caracteriza-se por alterações das células da série megacariocítica (SH SWERDLOW; CAMPO; HARRIS, 2008). Para o diagnóstico da TE são necessários que o paciente atenda critérios os maiores: (i) contagem plaquetária $\geq 450.000 \times 10^9/L$; (ii) biópsia de MO mostrando proliferação especialmente da linhagem megacariocítica com aumento de megacariócitos maduros e com núcleo hiperlobulado, sem desvio à esquerda de neutrófilos, fibras de reticulina com grau I; (iii) exclusão do diagnóstico de LMC, síndrome mielodisplásica (SMD) e outras neoplasias mieloides; (iv) presença da mutação JAK2V617F, CALR ou MPL. Na ausência de um dos critérios maiores, o diagnóstico pode ser confirmado pela constatação da presença de um marcador clonal ou exclusão de trombocitose reativa (ARBER et al., 2016).

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

O diagnóstico da MF é mais complexo do que o da PV e TE, e a organização mundial da saúde (OMS) recomenda critérios específicos para as fases diferentes da doença. O diagnóstico da MF em fase celular, ou pré-fibrótica baseia-se na presença de três critérios: (i) MO apresentando proliferação com atipias de megacariócitos, fibras de reticulina grau I, sangue periférico com hiper celularidade, proliferação granulocítica e a diminuição ou não da eritropoese; (ii) exclusão do diagnóstico para LMC, PV, ET, síndrome mielodisplásica e outras neoplasias mieloides; (iii) presença da mutação JAK2V617F, CALR, MPL ou outro marcador clonal, e ausência de fibrose reativa de reticulina na MO. Na ausência de algum desses critérios o diagnóstico desse ser baseado na presença de anemia, e/ou leucocitose acima de $11.000 \times 10^9/L$, e/ou esplenomegalia palpável, e/ou lactato desidrogenase (LDH) aumentada substitui um dos critérios chaves e fecha o diagnóstico para MF fase celular (ARBER et al., 2016).

No diagnóstico de MF em fase fibrótica, leva-se em consideração os mesmos critérios para a fase celular, contudo com as seguintes modificações nos critérios: (i) MO apresentando fibras de reticulina e/ou colágeno grau 2 ou 3; (ii) exclusão de mielofibrose reativa. Na ausência de um dos critérios, a presença de anemia, e/ou leucocitose acima de $11.000 \times 10^9/L$, e/ou esplenomegalia palpável, e/ou LDH aumentada, e/ou leucoeritroblastose, substitui um dos critérios essenciais e confirma o diagnóstico de MF fase celular (ARBER et al., 2016).

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

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

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

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

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

O ruxolitinibe, inibidor da tirosina quinase JAK2, foi aprovado em 2011 para pacientes com MF não responsivos ou intolerantes a HU. Hoje, é também recomendado como o tratamento de segunda linha para pacientes com PV

(VERSTOVSEK et al., 2016). Esse inibidor seletivo de JAK2 e JAK1 impede a fosforilação de STA3 ao competir com a ligação de ATP no sítio catalítico das JAK. Este medicamento foi capaz de promover a redução da esplenomegalia, a melhora dos sintomas e sobrevida, inclusive em pacientes negativos para a mutação (DEISSEROTH et al., 2012; HARRISON et al., 2017; MASCARENHAS; MUGHAL; VERSTOVSEK, 2012), mudanças significativas no grau de fibrose medular e a redução da carga alélica para pacientes JAK2V617F positivos (KVASNICKA et al., 2018; VANNUCCHI et al., 2017).

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

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

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

Doença	Características principais	Epidemiologia	Estratificação de riscos
Policitemia vera (PV)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Eritrocitose acentuada, com ou sem leucocitose e/ou trombocitose ✓ JAK2+ ✓ MO com hiperplasticidade panmielocítica ✓ Eritropoetina sérica subnormal 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Maiores de 60 anos ✓ Prevalência maior em mulheres ✓ Estimativa de vida: 14 anos ✓ Incidência: 0,68- 2,6/100.000/ano ✓ 5% progressão para LMA ✓ 30% progressão para MF 	<p style="text-align: center;">BAIXO</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Idade <60 anos ✓ Sem histórico de ETV (episódios de tromboembolismo venoso)
			<p style="text-align: center;">ALTO</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Idade >60 anos ✓ Histórico de ETV
Trombocitemia essencial (TE)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Trombocitose acentuada com eritropoese e granulopoese normais ✓ MO com megacariocitose, fibras de reticulina grau I ✓ JAK2V617F+, ou CALR+ ou MPL+ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Maiores de 60 anos ✓ Prevalência maior em mulheres ✓ Estimativa de vida: 20 anos ✓ Incidência: 0,38-1,7/100.000/ano ✓ 10-20% progressão para LMA ✓ 30% progressão para MF 	<p style="text-align: center;">MUITO BAIXO</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Idade ≤ 60 anos ✓ Sem histórico de ETV ✓ Ausência JAK2/MPL
			<p style="text-align: center;">BAIXO</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Idade ≤ 60 anos ✓ Sem histórico de ETV ✓ JAK2/MPL positivo
			<p style="text-align: center;">INTERMEDIÁRIO</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Idade >60 anos ✓ Sem histórico de ETV ✓ Ausência JAK2/MPL
			<p style="text-align: center;">ALTO RISCO</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Idade >60 anos ✓ Histórico de ETV ✓ JAK2/MPL mutados
Mielofibrose primária (MF)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Trombocitose e granulocitose, com ou sem eritropenia; OU anemia e/ou leucocitose ✓ MO com megacariocitose, fibras de reticulina grau 1; OU hipocelularidade, fibras de reticulina e/ou colágeno grau 3 ✓ JAK2V617F+, ou CALR+ ou MPL+ ✓ Esplenomegalia e leucoeritroblastose 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Maiores de 66 anos ✓ Prevalência igual entre homens e mulheres ✓ Estimativa de vida: de 2-11 anos ✓ Incidência: 0,1-1/100.000/ano ✓ 10% progressão para LMA 	<p style="text-align: center;">Variável – depende do score atingido pelo sistema de pontuação de prognóstica adotado</p>

1.2 Fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas

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

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

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

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

1.2.1 Mutações iniciadoras (*Driver*) e marcadores clonais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pacientes portadores da mutação *MPL* exibem um quadro clínico mais grave quando comparado com os pacientes portadores da mutação *JAK2V617F*, tanto em TE quanto em MF, indicando que existem diferenças na sinalização *JAK*-*STAT* ativada

por cada mutação (KILPIVAARA; LEVINE, 2008). A alta carga alélica da mutação MPL foi associada ao desenvolvimento de mielofibrose e poderia explicar a progressão de TE para MF (KATO, 2015).

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

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

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

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

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

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

1.3.1 Alterações da Apoptose

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2 Oncoinflamação

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

As células tumorais são capazes de modular as células imunológicas visando a criação de um ambiente pró-tumoral. Neste ambiente, as células tumorais evadem

da resposta imune. Tal modulação pode afetar os componentes efetores da resposta imune inata e adaptativa, por meio do aparecimento de células supressoras, células T reguladoras, citocinas e quimiocinas (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; RACHIDI et al., 2013).

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

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

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

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

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

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

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

1.3.3 Angiogênese

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

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

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

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

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

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

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

Níveis elevados de HGF foram observados no plasma de SP de pacientes com PV e MF, comparados ao grupo de indivíduos saudáveis, mas não apresentaram

diferença na comparação entre as duas doenças. O aumento de HGF foi correlacionado com o fenótipo dessas doenças, sendo observado a correlação com a leucocitose e sintomas microvasculares (VAIDYA et al., 2012).

1.3.4 Microambiente medular e a célula estromal mesenquimal

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.4.1 Sinalização celular por Vesículas extracelulares

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

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

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

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

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

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

Uma vez que já existem relatos a respeito de disfunções em MSC em NMP, é importante saber se tais alterações se estendem também sobre as propriedades antitumorais, apoptóticas, imunomodulatórias e angiogênicas desempenhadas pelas MSC via sinalização por VE. Por manter a assinatura da célula que a originou, o estudo das VE pode auxiliar na identificação de alterações de celulares até mesmo transitórias, desencadeadas pela tumorigênese.

Pelo presente exposto, se faz importante a elucidação da caracterização e função desempenhada pelas MSC nas NMP. Conhecer o comportamento das MSC de NMP, seu envolvimento com as patogêneses além das mutações condutoras, nesse caso, alterações do microambiente medular, inflamação, angiogênese e apoptose, e se a via de sinalização por VE atuaria nesses processos.

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

7. Conclusões



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

- 1) As MSC isoladas da MO de pacientes com PV, TE e MF possuem perfil imunofenotípico e multipotencialidade similares às das MSC isoladas da MO de indivíduos normais;
- 2) As MSC da MO de pacientes com PV, TE e MF são mais difíceis de serem estabelecidas *in vitro* e se expandem mais lentamente do que as MSC de indivíduos saudáveis;
- 3) As MSC isoladas de pacientes com PV apresentam resistência ao processo de morte celular, alterações moleculares e em suas propriedades imunomodulatórias;
- 4) O microambiente medular de pacientes PV, TE e MF apresentam perfil oncoinflamatório e pró-angiogênico, contrastando com o perfil apresentado pelo grupo CTRL.

8. Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAIVANO, A. et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9739–9752, dez. 2015.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1445–1451, jun. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KUILMAN, T. et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1019–1031, 13 jun. 2008.

KURTOVA, A. V. et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. **Blood**, v. 114, n. 20, p. 4441–4450, 12 nov. 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SAMSONRAJ, R. M. et al. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 12, p. 2173–2185, dez. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZHANG, L. et al. Early down-regulation of Bcl-xL expression during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-induced CD34+ bone marrow cells in essential thrombocythemia. **Haematologica**, v. 89, n. 10, p. 1199–1206, out. 2004.

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

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