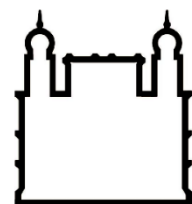




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**RASTREAMENTO DE MOLÉCULAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS  
EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

**RIFKATH MARIE LAURENCE RAHIMY**

**Salvador - Bahia**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**RASTREAMENTO DE MOLÉCULAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS**  
**EM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

**RIFKATH MARIE LAURENCE RAHIMY**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Patologia Humana para a obtenção do grau  
de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Dalila Luciola Zanette

**Salvador - Bahia**

**2022**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**R147r** Rahimy, Rifkath Marie Laurence.

Rastreamento de moléculas diferencialmente expressas em neoplasias mieloproliferativas/ Rifkath Marie Laurence Rahimy. \_ Salvador, 2022.

99f.: il.: 30 cm

Orientador: Profa. Dra. Dalila Luciola Zanette

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Células mesenquimais estromais. 2. Células tronco hematopoéticas. 3. Neoplasias mieloproliferativas. 4. Expressão gênica AKT/mTOR. 5. Expressão proteômica.I. Título.

CDU 616-006

**"Rastreamento de moléculas diferencialmente expressas em neoplasias mieloproliferativas".**

Rifkath Marie Laurence Rahimy

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 22 de fevereiro de 2022.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

Dr. Bruno Solano de Freitas Souza  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



---

Dra. Karine Araújo Damasceno  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dr. Daniel Pereira Bezerra  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



---

Dra. Maria Lourdes Farre Vallve  
Pesquisadora  
IGM/ FIOCRUZ



---

Dra. Dalila Lucíola Zanette  
Pesquisadora  
ICC/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina- UFBA

A todos os meus entes queridos que  
estiveram ao meu lado a cada momento  
desta jornada.

Obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, muito querida, a Dra. Dalila Luciola Zanette, por todo o carinho, a empatia, a paciência em me ensinar, o apoio a cada momento e em todos os momentos.

A Dra. Fabiola Attié de Castro e sua equipe, pela participação muito valiosa para o avanço do presente trabalho.

Ao Dr Bruno Cassinat e sua equipe no Instituto Saint Louis, pela oportunidade do estágio, pelo aprendizado, e a participação muito valiosa no presente trabalho.

A Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves, pela oportunidade da pós-graduação na Fiocruz.

A todos os docentes do Programa de pós-graduação PgPat, pelo importante conhecimento transmitido.

Aos colegas e todo o pessoal do Instituto Gonçalo Moniz, pela simpatia e o apoio.

Ao pessoal da plataforma de espectrometria de massas e do LACTAS, do Instituto Carlos Chagas, pelo aprendizado e o apoio.

RAHIMY, Rifkath Marie Laurence. **Rastreamento de moléculas diferencialmente expressas em neoplasias mieloproliferativas**. 99 f. il. (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As neoplasias mieloproliferativas (NMPs), mais especificamente a Policitemia vera (PV), a Trombocitemia essencial (TE) e a Mielofibrose primária (MFP), são um grupo de doenças clonais da medula óssea, compartilham a mutação JAK2V617F, entre outras características. As células estromais mesenquimais (MSCs) fazem parte do microambiente da medula óssea, e as influências mútuas das MSCs e do clone hematopoético são potenciais determinantes do fenótipo de NMP. **OBJETIVO:** O objetivo do presente trabalho foi investigar a expressão gênica e protéica das células estromais e hematopoéticas na PV, na TE e na MFP, em busca de moléculas que possam ser indicadas como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico destas neoplasias. **MATERIAL E MÉTODOS:** As MSCs foram obtidas da medula óssea e os leucócitos do sangue periférico de pacientes com PV, TE, MFP e de indivíduos saudáveis. Extratos proteicos foram obtidos de MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com PV e TE. Os RNAs de MSCs e de leucócitos periféricos de controles saudáveis e de pacientes com PV, TE e MFP foi extraído pelo método de Trizol. Os RNAs foram convertidos em cDNA para as análises de qPCR e os extratos proteicos foram utilizados para análise por espectrometria de massas. **RESULTADOS:** A análise do proteoma de PV e TE comparados a controles indicou a maior expressão de VPS26A, CTTN, MAP4, TPD52L2, FAM175B, BAX em amostras de MSCs de PV comparadas a MSCs de indivíduos saudáveis, enquanto a proteína TNC mostrou-se menos expressa na PV. Nas MSCs de TE houve maior expressão de ALDH1A3, PON2 e SCP2; e menor expressão de RAB21 e RANBP1. As análises *in silico* identificaram genes diferencialmente expressos em MFP quando comparadas a controles, sendo que essas diferenças foram verificadas nas amostras de sangue periférico de um número maior de pacientes, com expressão diferencial significativa dos genes AVEN e CRACD, embora a expressão nos leucócitos tenha sido contrária àquela verificada nas MSCs de medula óssea. **CONCLUSÕES:** Os resultados obtidos indicam a expressão diferencial de algumas moléculas que podem ser potenciais marcadores das diferentes NMPs.

**Palavras-chave:** Células mesenquimais estromais. Células tronco hematopoéticas. Neoplasias mieloproliferativas. Expressão gênica. Expressão proteômica.



RAHIMY, Rifkath Marie Laurence. **Screening of differentially expressed molecules in myeloproliferative neoplasms**. 99 f. il. (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Myeloproliferative neoplasms (MPNs), more specifically Polycythemia vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (PMF), are a group of clonal bone marrow diseases that share the JAK2V617F mutation. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are part of the bone marrow microenvironment, and the mutual influences of MSCs and the hematopoietic clone are potential determinants of the MPN phenotype. **AIM:** The objective of the present work was to investigate the gene and protein expression of stromal and hematopoietic cells in PV, ET and PMF, in search of molecules that can be indicated as diagnostic and prognostic biomarkers. **MATERIAL AND METHODS:** MSCs were obtained from bone marrow and peripheral blood leukocytes from patients with PV, TE, PMF and healthy subjects. Four MSCs samples of each disease, excluding PMF, had their protein extracts isolated by cell lysis, and their RNAs extracted by the Trizol method. RNAs were converted into cDNA for qPCR analysis and protein extracts were used for mass spectrometry analysis. In silico analyses were performed using public transcriptome data in order to select differentially expressed genes in PMF. **RESULTS:** The proteome analysis of PV and TE compared to controls indicated a higher expression of VPS26A, CTTN, MAP4, TPD52L2, FAM175B, BAX in MSCs samples of PV compared to MSCs from healthy subjects, while the TNC protein was less expressed in the PV. In MSCs from TE, there was higher expression of ALDH1A3, PON2 and SCP2; and lower expression of RAB21 and RANBP1. In silico analyses identified genes differentially expressed in PMF when compared to controls, and these differences were verified in peripheral blood samples from a greater number of patients, with significant differential expression of the AVEN and CRACD genes, although the expression in leukocytes has been contrary to that seen in bone marrow MSCs. **CONCLUSIONS:** The results obtained indicate the differential expression of some molecules that can be differential potential markers of MPNs.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, myeloproliferative neoplasms, gene expression, proteomics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Nicho das células tronco hematopoéticas da medula óssea adulta na homeostase Fonte: (PINHO; FRENETTE, 2019).....	17
<b>Figura 2</b> - Ativação fisiológica e patológica de MPL e JAK2. (A) MPL é um monômero inativo pré-ligado a JAK2.....	23
<b>Figura 3</b> - Mecanismos patogênicos na mielofibrose envolvendo sinalização JAK-STAT desregulada. ....	24
<b>Figura 4</b> - Expressão de mutantes CALR leva à formação de complexo com MPL no retículo endoplasmático e transporte para a superfície celular através da via secretora.....	25
<b>Figura 5</b> - Características laboratoriais de policitemia Vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária . ....	34
<b>Figura 6</b> - Proteínas diferencialmente expressas nas NMPs de acordo com a análise utilizando R.....	50
<b>Figura 7</b> - Proteínas em comum nas análises com os dois softwares, Perseus e R .....	51
<b>Figura 8</b> - Expressão dos genes que codificam as proteínas diferencialmente reguladas .....	53
<b>Figura 9</b> - Expressão em leucócitos do sangue periférico dos genes que codificam as proteínas diferencialmente expressas.....	54
<b>Figura 10</b> - Expressão gênica nas MSCs da medula óssea em PV, TE, MFP e controles saudáveis ...	56
<b>Figura 11</b> - Expressão gênica em leucócitos do sangue periférico em PV, TE, MFP e controles saudáveis. ....	58
<b>Figura 12</b> - Vias de sinalização na PV, segundo a análise na ferramenta Metacore .....	60
<b>Figura 13</b> - Redes de sinalização na PV, segundo a análise na ferramenta Metacore.....	61
<b>Figura 14</b> - Vias de sinalização na TE, segundo a análise na ferramenta Metacore .....	63
<b>Figura 15</b> - Redes de sinalização na TE, segundo a análise na ferramenta Metacore .....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Critérios diagnósticos da PV, TE e MFP segundo a OMS 2016.....	32
<b>Tabela 2</b> - Critérios diagnósticos para a mielofibrose primária segundo a OMS 2016.....	32
<b>Tabela 3</b> - Caraterísticas e genotipagem dos pacientes com PV, TE ou MFP .....	47
<b>Tabela 4</b> - Top 10 das proteínas com maior diferença de expressão na PV em relação aos controles saudáveis, de acordo com a análise no Perseus .....	49
<b>Tabela 5</b> - Top 10 das proteínas com maior diferença de expressão em TE em relação aos controles saudáveis, de acordo com a análise no Perseus .....	49
<b>Tabela 6</b> - Análise de rede de processos unicamente modulados na PV, usando o Metacore.	65
<b>Tabela 7</b> - Análise de rede de processos unicamente modulados na TE, usando o Metacore.	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS12: *A Disintegrin And Metalloproteinase Domain with Thrombospondin Type 1 Motif 12*

ASXL1: *Additional Sex Combs Like 1, Transcriptional Regulator*

AVEN: *Apoptosis and Caspase Activation Inhibitor*

BCR-ABL1 + CML: Leucemia mieloide crônica positiva para a BCR/ABL

BP: Pares de bases

CALR: Calreticulina

CRACD: *Capping Protein Inhibiting Regulator of Actin Dynamics*

CTH: Células-tronco hematopoéticas

CTRL-MSC: Células mesenquimais estromais (*Mesenchymal stem cells*) de controles saudáveis

CTTN: Cortactina

CXCL12: Ligante 12 de quimiocina de motivo C-X-C

CXCR4: Receptor de quimiocina C-X-C de tipo 4.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMT3A: DNA metiltransferase 3A

EROS: Espécies reativas do oxigênio

EZH2: Intensificador de Enhancer of zeste homolog 2 do inglês *Enhancer of zeste homolog 2*

FRZB: *Frizzled Related Protein*

HAND2: *Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2*

HAND2-AS1: *Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2 Antisense RNA 1*

HEM: Hematopoese extramedular

HHIPL2: *Hedgehog Interacting Protein Like 2*

HIF1A: Fator 1 induzível por hipóxia, subunidade alfa

HMGB1: proteína de grupo 1 de alta mobilidade

IDH1/2: Isocitrato Desidrogenase (NADP(+)) 1 ou 2

JAK2: Janus kinase 2

MAP4: Proteína associada ao microtúbulo 4

MEC: Matriz extracelular

MFP: Mielofibrose primária

MMO: Microambiente da medula óssea

MO: Medula óssea

MPL: Vírus da leucemia mieloproliferativa, do inglês *Myeloproliferative leukemia virus*

MSC: Células mesenquimais estromais (*Mesenchymal stem cells*)

NMPs: Neoplasias mieloproliferativas

OMS: Organização Mundial da Saúde

PON2: Paraoxonase 2

PV: Policitemia vera

PV-MSC: Células mesenquimais estromais de pacientes com Policitemia vera

RAB21: *RAS-related protein RAB21*

RANBP1: *RAN binding protein 1*

SBF: Soro Bovino Fetal

SMD: Síndrome mielodisplásica

SOX5: *Sex-determining Region Y-Box Transcription Factor 5*

SP: Sangue periférico

SRSF2: Fator de Splicing Rico em Serina e Arginina 2

STAT: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição

STEAP4: *Six Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate*

TET2: Ten-eleven-translocation 2

TE: Trombocitemia essencial

TE-MSC: Células mesenquimais estromais de pacientes com Trombocitemia essencial

TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformante beta tipo 1

TNC: Tenascina-C

TNF: Fator de necrose tumoral

TPO: Trombopoetina

WT: Tipo selvagem (*wild type*)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS .....	16
1.2 MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA.....	16
1.3 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS.....	17
1.3.1 Aspectos históricos e identificação .....	17
1.3.2 Fontes de obtenção .....	18
1.3.3 Funções biológicas .....	19
1.4 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS .....	19
1.4.1 Classificação e definição .....	19
1.4.2 Incidência .....	20
1.4.3 Patogênese das neoplasias mieloproliferativas .....	21
1.4.3.2 Papel do microambiente da medula óssea.....	25
1.4.3.3 Células estromais mesenquimais nas neoplasias mieloproliferativas.....	26
1.4.4 Policitemia Vera (PV).....	27
1.4.5 Trombocitemia Essencial (TE) .....	28
1.4.6. Mielofibrose Primária (MFP).....	29
1.4.7 Diagnóstico .....	31
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	35
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 PACIENTES E CONTROLES .....	37
4.2 OBTENÇÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS .....	37
4.3 DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES EM MSCs.....	38
4.3.1 Detecção da mutação JAK2V617F.....	38
4.3.2 Detecção da mutação CALR.....	39
4.4 ANÁLISE DE PROTEÔMICA .....	40
4.5 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> .....	42
4.6 EXTRAÇÃO DE RNA .....	43
4.7 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR) .....	43
4.8 ANÁLISE DE VIAS DE SINALIZAÇÃO .....	44
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	44

4.10 ASPECTOS ÉTICOS .....	45
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
5.1 CARACTERÍSTICAS E GENOTIPAGEM DOS PACIENTES .....	46
5.2 ANÁLISE DE PROTEÔMICA .....	48
5.2.1 <b>Proteínas diferencialmente expressas em MSCs de PV e de TE</b> .....	<b>48</b>
5.2.2 <b>Validação dos genes que codificam as proteínas diferencialmente expressas em...</b>	<b>51</b>
<b>MSCs da medula óssea</b> .....	<b>51</b>
5.2.3 <b>Validação dos genes que codificam as proteínas diferencialmente expressas em...</b>	<b>54</b>
<b>leucócitos do sangue periférico</b> .....	<b>54</b>
5.3 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MSCs DE.....	55
5.3.1 <b>Expressão gênica em MSCs da medula óssea</b> .....	<b>55</b>
5.3.2 <b>Análise em leucócitos do sangue periférico</b> .....	<b>57</b>
5.4 ANÁLISE DE VIAS DE SINALIZAÇÃO UTILIZANDO O METACORE .....	59
5.4.1 <b>Policitemia Vera: PV-MSC versus CTRL-MSC</b> .....	<b>59</b>
5.4.2 <b>Trombocitemia Essencial: TE-MSC versus CTRL-MSC</b> .....	<b>61</b>
5.4.3 <b>Comparação de PV-MSC e TE-MSC</b> .....	<b>62</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>91</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS

As células tronco hematopoéticas (CTHs) fazem parte do sistema hematopoético. Em adultos, elas têm origem na medula óssea e, portanto, podem ser encontradas na medula óssea, mas também no sangue periférico. As CTHs dão origem às diferentes células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas (BRYDER; ROSSI; WEISSMAN, 2006; NG; ALEXANDER, 2017).

Em adultos, as CTHs são encontradas principalmente na medula óssea e são caracterizadas por sua capacidade de autorrenovação e produção de vários progenitores que proliferam e se diferenciam em células sanguíneas maduras (LAURENTI; GÖTTGENS, 2018; PINHO; FRENETTE, 2019).

As CTHs são essenciais para reconstituir o sistema hematopoético após o transplante com ablação de medula (JACOBSON et al., 1951; TILL; MCCULLOCH, 1961) ou após lesão ou infecção (WILSON et al., 2008; ESSERS et al., 2009).

No entanto, os progenitores comprometidos têm capacidade limitada de autorrenovação, exibem potencial de diferenciação de linhagem restrito e esgotam-se dentro de algumas semanas após o transplante (LAURENTI; GÖTTGENS, 2018).

Para garantir a homeostase do sistema hematopoético ao longo da vida, o equilíbrio entre diferenciação e autorrenovação precisa ser rigidamente regulado: diferenciação excessiva ou autorrenovação insuficiente esgotam o pool de CTHs, enquanto diferenciação insuficiente ou autorrenovação irrestrita podem levar a neoplasias mieloproliferativas ou leucemia (OLSON; KANG; PASSEGUÉ, 2020).

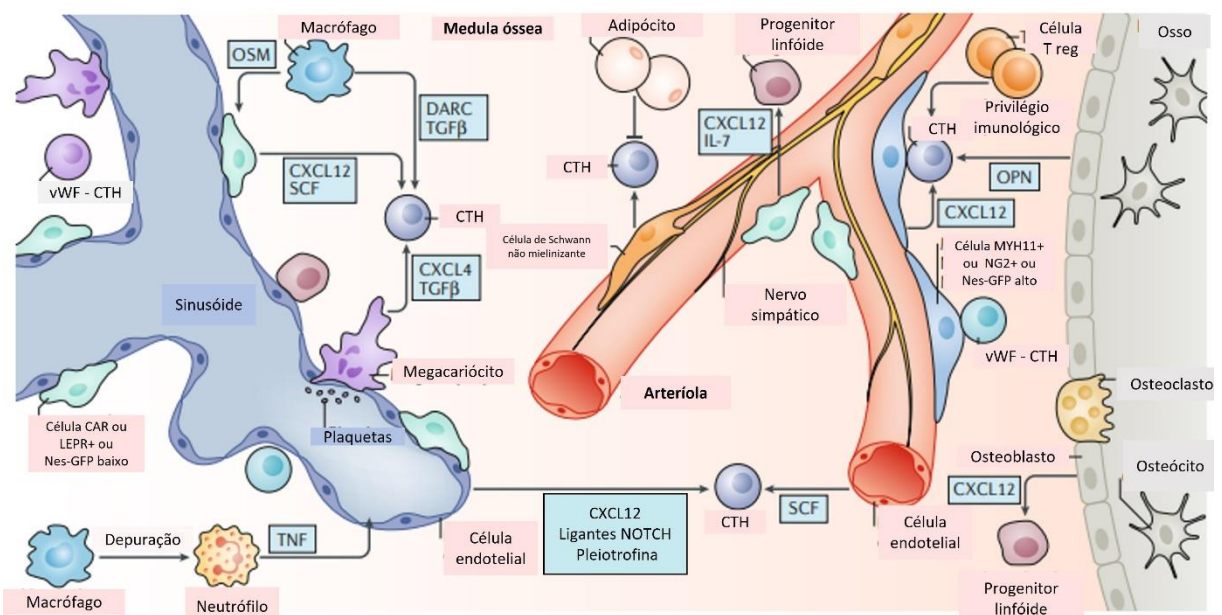
A atividade da CTH é regulada por uma interação de fatores intrínsecos, como reguladores transcricionais e epigenéticos e vias metabólicas, e sinais extrínsecos, incluindo sinais humorais e neurais de longo alcance ou sinais locais do microambiente da medula óssea (PINHO; FRENETTE, 2019).

### 1.2 MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA

A hematopoese é o processo de formação de todas as células sanguíneas a partir das CTHs e ocorre na medula óssea. É um processo altamente regulado, a fim de adaptar a produção das células sanguíneas às necessidades do organismo. As CTHs, que dão origem a todas as



células hematopoiéticas ao longo da vida adulta, residem na medula óssea em um microambiente especializado denominado "nicho", no qual são rigidamente reguladas (ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017). Essa regulação necessita de condições específicas dentro do microambiente da medula óssea para manter as características de multipotência e autorrenovação das CTHs, bem como para garantir a diferenciação adequada das células progenitoras para cada linhagem hematopoética (WILSON; TRUMPP, 2006; ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017; GOMES; SARAIVA; GOMES, 2021; MAN et al., 2021). A figura 1 representa o nicho da CTH na medula óssea (PINHO; FRENETTE, 2019).



**Figura 1** - Nicho das células tronco hematopoéticas da medula óssea adulta na homeostase Fonte: (PINHO; FRENETTE, 2019)

### 1.3 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

#### 1.3.1 Aspectos históricos e identificação

As denominadas células estromais mesenquimais (MSCs para o inglês *mesenchymal stem cells*) são uma população heterogênea de células com morfologia fibroblastóide (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008; DENU et al., 2016). Elas foram originalmente descobertas por A.J. Friedenstein, e são caracterizadas por sua capacidade de aderir a placas de cultura, de gerar colônias semelhantes a fibroblastos e de ser expandidas in vitro (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970; FRIEDENSTEIN et al., 1974; FRIEDENSTEIN, 1995; HORWITZ et al., 2005). Friedenstein foi o primeiro a mostrar que

essas células do estroma são responsáveis pela criação do microambiente do tecido hematopoiético, uma vez que o transplante dessas células sob a cápsula renal de cobaias resultou não só na formação óssea, mas também transferiu as propriedades do suporte hematopoiético do estroma da medula óssea (FRIEDENSTEIN et al., 1974; FRIEDENSTEIN, 1995). Essas células foram originalmente designadas como fibroblastos da unidade formadora de colônias, e tinham a capacidade de se diferenciar em tecidos ósseos e cartilagosos (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970; FRIEDENSTEIN; LALYKINA, 1972; FRIEDENSTEIN, 1976). Embora a terminologia de células-tronco mesenquimais tenha sido posteriormente adaptada para indicar as capacidades de diferenciação multipotente dessas células (CAPLAN, 1991; PITTENGER et al., 1999), elas também são comumente referidas como células estromais mesenquimais (VISWANATHAN et al., 2014).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular propõe 3 critérios mínimos para definir as MSCs humanas. Em primeiro lugar, as MSCs devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições de cultura padrão. Em segundo lugar, as MSCs devem expressar os antígenos de superfície específicos CD105, CD73 e CD90, e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR. Por fim, devem ter um potencial de diferenciação multipotente para osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006; KFOURY; SCADDEN, 2015; NAJI et al., 2019).

### 1.3.2 Fontes de obtenção

As MSCs podem ser obtidas de diferentes tecidos adultos, a exemplo do tecido adiposo, do sangue periférico e da medula óssea, e de tecidos neonatais, como partes específicas da placenta e cordão umbilical (HASS et al., 2011). A medula óssea é a fonte mais utilizada, por ser mais bem documentada e predominantemente utilizada nos estudos pré-clínicos e clínicos. As MSCs foco do presente trabalho são as MSCs da medula óssea. Na medula óssea, a proporção de MSCs foi estimada de 0,001 a 0,01% do total de células nucleadas (PITTENGER et al., 1999).

As MSCs são isoladas a partir da aspiração da medula óssea da crista ilíaca do doador, sob anestesia local. A medula puncionada é centrifugada em gradiente Ficoll para isolamento das células mononucleares, que em seguida são semeadas em garrafas de cultivo celular para permitir que as MSCs sejam isoladas por aderência ao plástico e capacidade de expansão *in vitro* (GUDLEVICIENE et al., 2015).

### 1.3.3 Funções biológicas

As MSCs são células multipotentes, dotadas de função de proliferação e de função trófica, que contribuem para a estrutura e a função do microambiente da medula óssea, no qual elas desempenham um papel importante na manutenção, autorrenovação, expansão e diferenciação das CTHs, e portanto, sustentam a hematopoese (KEATING, 2006). Diferentes progênes de MSCs podem secretar fatores de suporte para as CTHs, como a quimiocina Ligante 12 de motivo C-X-C (CXCL12), a angiopoetina, o fator de célula-tronco e outros, mas existem diferenças de acordo com o tipo de MSC e localização, ou seja, arteriolar ou sinusoidal (ASADA et al., 2017). Além disso, as MSCs têm funções de *homing* / migração e imunossupressão que foram demonstradas *in vitro* e *in vivo* (NAJI et al., 2019).

Os osteoblastos do microambiente da medula óssea são derivados de MSCs multipotentes, e são importantes para a manutenção das CTHs, especialmente no que diz respeito ao tráfego das CTHs. Suas funções regulatórias dependem do estágio de diferenciação osteoblástica: a população de progenitores de osteoblastos imaturos influencia a manutenção / proliferação das CTHs e os osteoblastos maduros modulam sua diferenciação (GALÁN-DÍEZ; KOUSTENI, 2018). Vários fatores solúveis derivados da população de osteoblastos atuam no destino do pool das CTHs, incluindo o CXCL12, a angiopoietina-1 e a osteopontina, além de várias outras citocinas e quimiocinas, a principal fonte de CXCL12 no estroma sendo as MSCs (CALVI et al., 2003; SCHMITT-GRAEFF; NITSCHKE; ZEISER, 2015; CURTO-GARCIA; HARRISON; MCLORNAN, 2020).

## 1.4 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

### 1.4.1 Classificação e definição

A classificação dos tumores hematológicos e dos tecidos linfóides foi revisada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016. As neoplasias mielóides são classificadas em duas categorias, a leucemia mielóide aguda e as neoplasias mielóides crônicas, com base na porcentagem de blastos no sangue periférico ou na medula óssea. As neoplasias mielóides crônicas são por sua vez classificadas em quatro categorias operacionais: as síndromes mielodisplásicas (SMD), as neoplasias mieloproliferativas (NMP), as síndromes de sobreposição SMD/NMP, e as neoplasias mielóides e linfóides com eosinofilia e rearranjos recorrentes de Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas A (PDGFRA), PDGFRB

e Receptor 1 do Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGFR1) ou fusão do gene *Pericentriolar Material 1* com JAK2 (PMC1-JAK2). As NMPs são geralmente diferenciadas tanto das SMD quanto das SMD/MPN pela ausência de displasia morfológica (ausência de diseritropoiese, de disgranulopoiese e de monocitose) (BARBUI et al., 2018)

A categoria das NMPs, inclui sete subcategorias, sendo as três principais a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP); a leucemia mieloide crônica (associada à mutação BCR-ABL), a leucemia neutrofílica crônica, a leucemia eosinofílica crônica sem outra especificação, e a NMP não classificável (MPN-U); a mastocitose não é mais classificada na categoria NMP (ARBER et al., 2016; BARBUI et al., 2018).

O principal foco do trabalho são a PV, a TE e a MFP, que constituem um grupo de NMPs relacionado a mutações nos genes da Janus kinase 2 (JAK2), da calreticulina (CALR) e do vírus da leucemia mieloproliferativa (MPL), também conhecido como receptor da trombopoetina (TPO).

As NMPs são neoplasias hematológicas crônicas caracterizadas pela proliferação clonal de células tronco hematopoéticas, resultando em produção excessiva de um ou mais subtipos de células mieloides (eritrócitos, leucócitos, plaquetas) em várias combinações. As NMPs compõem um grupo de doenças com algumas características em comum, mas também com peculiaridades únicas que as distinguem umas das outras e resultam nos diferentes prognósticos e tratamentos existentes (TEFFERI; THIELE; VARDIMAN, 2009). A compreensão destes aspectos diferenciais é essencial para uma abordagem clínica correta.

#### 1.4.2 Incidência

Dados de 1935 até 2010 analisados em uma revisão sistemática mostraram taxas de incidência internacionais combinadas de 0,84, 1,03 e 0,47 por 100.000 para PV, TE e MFP, respectivamente, analisando dados da Europa, América do norte, Austrália e Ásia (TITMARSH et al., 2014).

Dados mais recentes de 2001 a 2016, do programa *Surveillance, Epidemiology and End Results* nos Estados Unidos da América, relataram taxas de incidência gerais de 1,18, 1,14 e 0,33 por 100.000 para PV, TE e MFP, respectivamente (SHALLIS et al., 2020).

Dados no Brasil provenientes do DATASUS evidenciam um aumento progressivo no número de pacientes afetados pelas NMPs. Em 2008 foram 1.545 pacientes e em 2017 foram 4.012 diagnósticos (PICOLI et al., 2019).

### 1.4.3 Patogênese das neoplasias mieloproliferativas

#### 1.4.3.1 Alterações genéticas relacionadas às NMPs

As NMPs surgem nas CTHs da medula óssea como resultado da aquisição de mutações somáticas, que proporcionam uma vantagem seletiva para as CTHs mutantes sobre as CTHs normais, e desregulam a diferenciação mielóide, gerando anomalias no crescimento celular e um fenótipo mieloproliferativo. Ocorre remodelação do nicho da medula óssea que suporta o crescimento das células neoplásicas às custas da hematopoese normal (MEAD; MULLALLY, 2017; PINHO; FRENETTE, 2019).

Nas NMPs classicamente negativas para a mutação BCR-ABL (PV, TE e MFP), a mieloproliferação clonal está frequentemente associada a mutações somáticas, mutuamente exclusivas, nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*. Normalmente, as mutações são adquiridas e não hereditárias, embora, em casos raros, existam famílias nas quais diversos membros apresentam esses distúrbios (BELLANNÉ-CHANTELOT et al., 2006; LANDGREN et al., 2008).

Tanto as mutações que levam à substituição de um aminoácido em *JAK2* ou *MPL*, quanto as mutações de *frameshift* em *CALR* resultando em uma proteína com alterações na extremidade C-terminal, levam à ativação da via de sinalização patológica e persistente da via JAK-STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*), com ativação constitutiva de *MPL*. O *MPL* é crucial para a renovação das CTHs, para a diferenciação dos megacariócitos e para a formação das plaquetas. O receptor *MPL* pode ser ativado por diversos mecanismos nas NMPs. A figura 2 apresenta a ativação fisiológica e patológica de *JAK2* e *MPL*. A ativação fisiológica ocorre na presença do ligante (citocina) no receptor *MPL*.

A ativação patológica e persistente da via de sinalização JAK-STAT ocorre, mesmo na ausência de ligante no receptor *MPL*, quando existe mutação ativadora de *MPL* ou de *JAK2* (CONSTANTINESCU et al., 2021). A ativação (fisiológica ou patológica) de *JAK2* desencadeia reações intracelulares, levando à ativação de *STAT*, que é um fator de transdução ativador da transcrição do DNA. Uma vez ativado e translocado para o núcleo, o fator *STAT* ativa a transcrição de genes relacionados com proliferação e sobrevivência celular. As consequências da ativação de *JAK2* são demonstradas na figura 3 (MUGHAL et al., 2014).

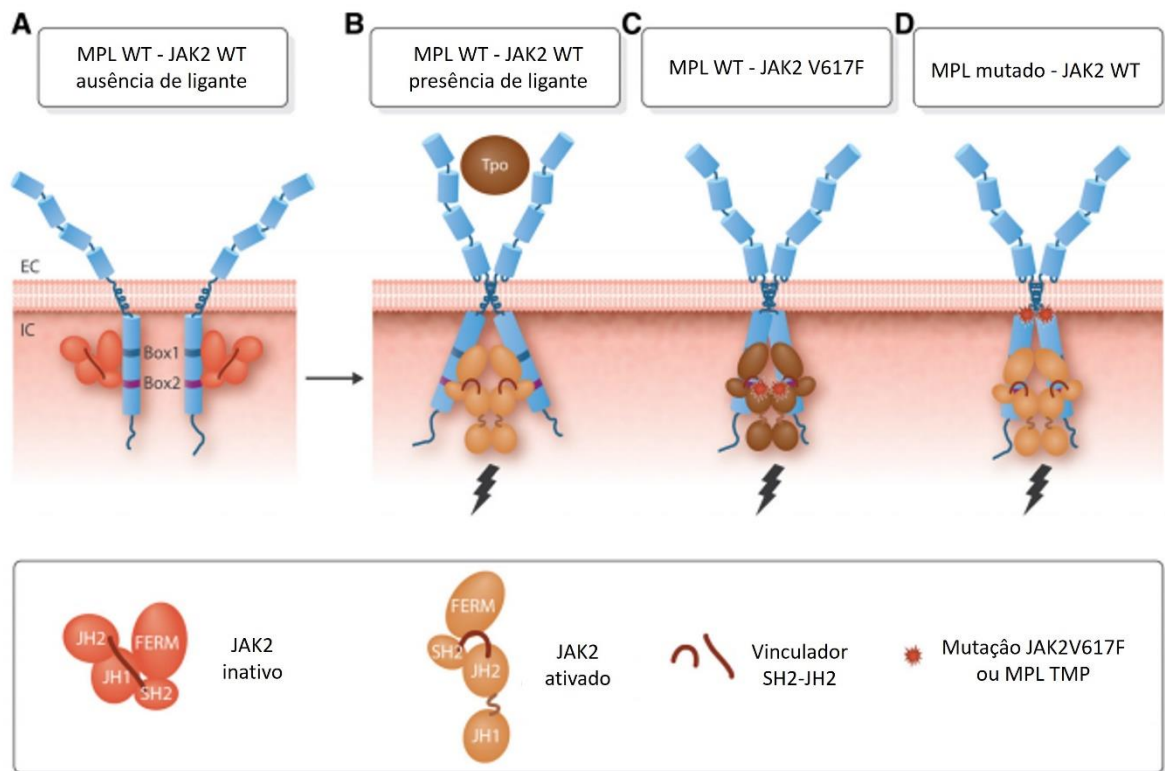
Quanto às mutações *CALR*, elas levam à uma ativação intracelular de *JAK2*, via ligação patológica a *MPL* e formação de complexos de proteínas *CALR* mutantes-*MPL* no retículo

endoplasmático. A consequência é a dimerização de receptores MPL imaturos, que ficam ativados persistentemente. Esses complexos são transportados via retículo endoplasmático até a membrana celular, de onde vão desencadear redes celulares relacionadas à ativação da via JAK-STAT. A consequência da expressão de CALR mutado é ilustrada na figura 4 (CONSTANTINESCU et al., 2021).

A mutação mais prevalente, a substituição da valina pela fenilalanina na posição 617 da proteína JAK2 (JAK2 V617F) é localizada no domínio pseudoquinase de JAK2. Este domínio regula negativamente atividade quinase da proteína. A mutação JAK2V617F leva à desestabilização deste domínio, com consequente perda de atividade auto-inibitória (PERCY; MCMULLIN, ; MARIE; HERVÉ, 2006).

A mutação JAK2V617F está associada à PV, TE e MFP, enquanto mutações em CALR e MPL estão associadas apenas com TE e MFP. Pacientes com TE e MFP triplo negativos para JAK2V617F, CALR e MPL não apresentam as mutações mais comuns mas podem abrigar mutações não-canônicas em JAK2 ou MPL (CONSTANTINESCU et al., 2021).

Além disso, mutações somáticas adicionais em vários outros genes envolvidos na regulação epigenética, de spliceossomos, de vias de sinalização de citocinas e de fatores de transcrição (*TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *CBL*, *LNK*, *IDH1 / 2*, *IKF1*, *EZH2*, *TP53*, *SRSF2*), ocorrem em 35% - 40% dos casos NMPs (SILVENNOINEN; HUBBARD, 2015; CONSTANTINESCU et al., 2021). Essas mutações não são específicas das NMPs, mas foram incluídas recentemente em um algoritmo de diagnóstico (GRINFELD et al., 2018). Mutações epigenéticas, como aquelas em *TET2*, *EZH2*, *ASXL1* ou *DNMT3A*, promovem hematopoese clonal, e o acúmulo de várias mutações epigenéticas e de *splicing* favorece a progressão das NMPs para leucemia mieloide aguda secundária (CONSTANTINESCU et al., 2021).

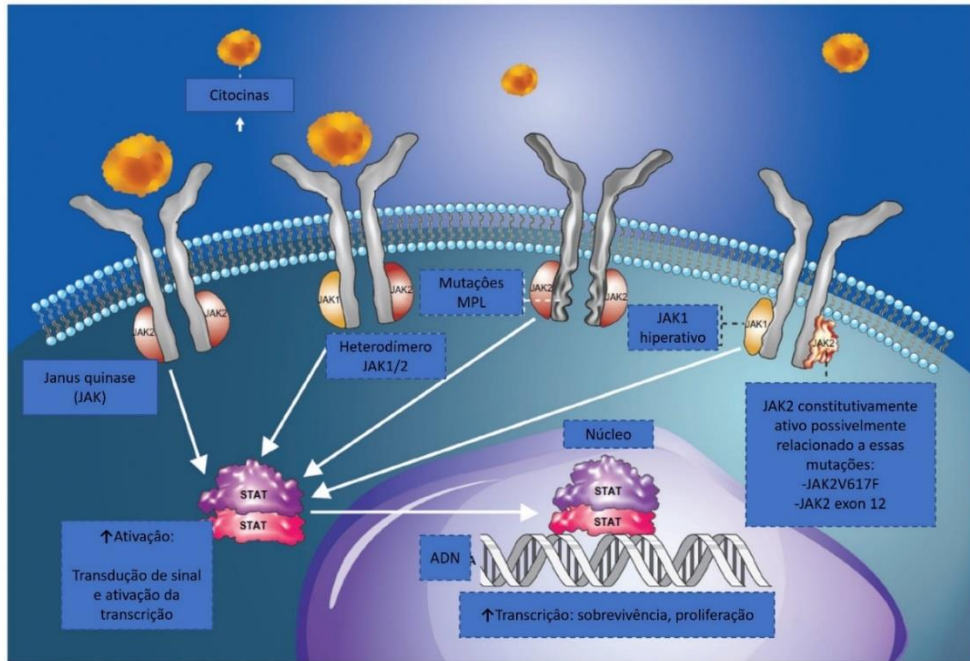


<sup>1</sup>**Figura 2** - Ativação fisiológica e patológica de MPL e JAK2. (A) MPL é um monômero inativo pré-ligado a JAK2.

Fonte: (CONSTANTINESCU et al., 2021)

<sup>1</sup> Os domínios de JAK2 são representados em amarelo. Os boxes 1 e 2 são motivos em receptores de citocinas que são importantes para a ligação de JAK2 aos receptores. A suposta relação espacial entre diferentes domínios de JAK2 em conformações inativas e ativas é mostrada no painel inferior. (B) A ligação de TPO a MPL induz a dimerização e altera a conformação dos domínios transmembrana e citosólico de modo que as proteínas JAK2 anexadas ativem-se mutuamente. (C) Na presença de JAK2V617F em vez de JAK2, MPL é dimerizado por meio de seu domínio citosólico, na ausência de ligante. A conformação dos dímeros do receptor parece ser ligeiramente diferente daquela da dimerização de MPL induzida por TPO. (D) Quando mutações ativadoras são adquiridas nos domínios TMD e JMD do MPL, a conformação dimérica muda, com uma menor inclinação e cruzamento no nível TMD, levando à ativação persistente de JAK2 de tipo selvagem.

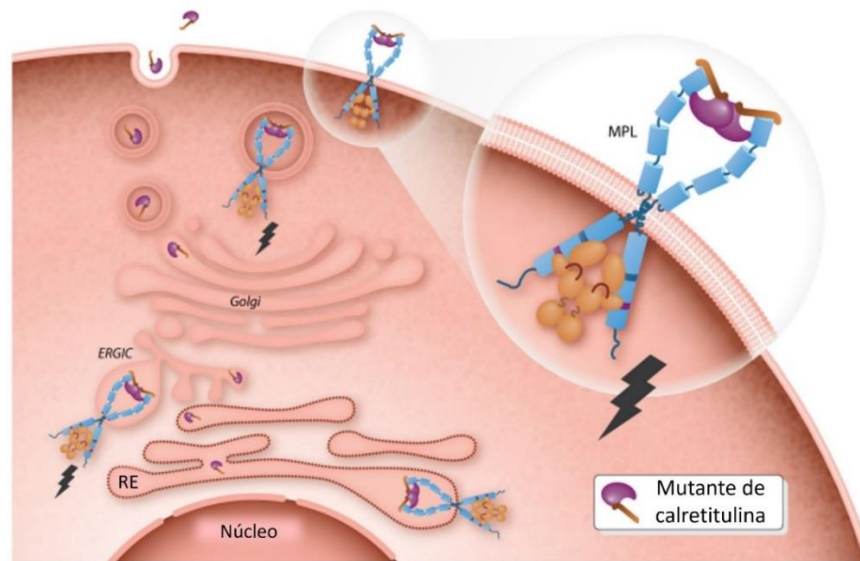
EC = extracelular; EPOR = receptor de eritropoietina; FERM = 4.1, Ezrin, Radixin Moesin; IC = intracelular; JAK2 = Janus kinase 2; JH1 / 2 = Homologia Janus 1/2; JMD = domínio justamembrana; MPL = receptor de trombopoietina; SH2 = Src-Homology 2; TMD = domínio transmembrana; TPO = trombopoietina; TpoR = receptor de trombopoietina; WT = tipo selvagem.



<sup>2</sup>**Figura 3** - Mecanismos patogênicos na mielofibrose envolvendo sinalização JAK-STAT desregulada.  
**Fonte:** (MUGHAL et al., 2014)

<sup>2</sup> Mecanismos patogênicos na mielofibrose envolvendo sinalização JAK-STAT desregulada. Mutações que afetam a função do receptor de citocinas (por exemplo, mutações MPL causando ativação autônoma do ligante do receptor da trombopoietina) ou mutações JAK2 resultando em atividade JAK2 constitutiva levam à superativação da sinalização JAK-STAT em células-tronco hematopoéticas, com conseqüente mieloproliferação e produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias. STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição.





<sup>3</sup>**Figura 4** - Expressão de mutantes CALR leva à formação de complexo com MPL no retículo endoplasmático e transporte para a superfície celular através da via secretora.  
**Fonte:** (CONSTANTINESCU et al., 2021)

#### 1.4.3.2 Papel do microambiente da medula óssea

Além das mutações, o microambiente da medula óssea (MMO) é importante na patogênese das NMPs. Estudos mostraram que o MMO desempenha um papel importante na iniciação e progressão das NMPs. Mudanças no microambiente da MO por si só podem impulsionar hematopoese alterada e neoplasias hematológicas malignas. Durante a progressão das NMPs, as CTHs mutantes transformam o nicho em um microambiente hospitaleiro para elas mesmas, o que acelera a progressão da doença, criando um ciclo de feedback positivo no qual as CTHs mutantes prosperam e continuam a alterar MMO a seu favor e às expensas das CTHs normais (LUO, 2014; SCHMITT-GRAEFF; NITSCHKE; ZEISER, 2015).

O microambiente da medula óssea é um sistema muito complexo, constituído por populações heterogêneas de células estromais, tais como células osteoblásticas, osteoclastos, osteócitos, adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, células mesenquimais estromais, macrófagos, células reticulares abundantes em CXCL12, células nervosas simpáticas e outras células, além de elementos não celulares como matriz extracelular (MEC). Esses fatores regulam e influenciam diferentes funções que caracterizam as CTHs, em particular a

<sup>3</sup>A sinalização de JAK2 é ativada intracelularmente, o limite necessário para a transformação das células hematopoiéticas é alcançado apenas quando o complexo atinge a superfície da célula. As proteínas CALR mutantes também são secretadas. A ligação e ativação de MPL requerem o domínio de ligação de lectina N-terminal de mutantes de calreticulina e sua cauda carregada positivamente. As posições relativas precisas desses domínios de mutantes de CALR são desconhecidas. RE = retículo endoplasmático; ERGIC = compartimento intermediário de golgi do retículo endoplasmático; MPL = receptor de trombopoetina;

localização, proliferação, quiescência, diferenciação e autorrenovação (ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017; KUMAR; GODAVARTHY; KRAUSE, 2018; MAN et al., 2021).

As CTHs da medula óssea e seus nichos estão localizados próximo ao revestimento endosteal da medula óssea (nicho endosteal) ou estão em contato próximo com o endotélio dos sinusóides (nicho vascular) (WILSON; TRUMPP, 2006). O nicho endosteal contém osteócitos, matriz óssea e CTHs quiescentes, e nicho vascular contém CTHs em divisão ativa, endotélio sinusoidal, células reticulares abundantes em CXCL12 e células mesenquimais estromais.

As interações múltiplas e complexas com o microambiente da medula óssea influenciam a fisiologia das CTHs, bem como a fisiopatologia das doenças neoplásicas hematológicas. Reciprocamente, as neoplasias hematológicas alteram o microambiente da medula óssea, podendo torná-lo mais hospitaleiro para a progressão (KUMAR; GODAVARTHY; KRAUSE, 2018; KOKKALIARIS; SCADDEN, 2020). Há evidências de que mudanças no microambiente da medula óssea podem levar a anormalidades no sistema hematopoético e, portanto, influenciar o curso das neoplasias hematológicas (LUO, 2014; AGARWAL; BHATIA, 2015; VERMA; KRAUSE, 2017; HOFFMAN; MARCELLINO, 2020; MAN et al., 2021)..

#### 1.4.3.3 Células estromais mesenquimais nas neoplasias mieloproliferativas

Vários mecanismos estão implicados na expansão osteoblástica desregulada, como a superestimulação de MSCs, levando à produção de osteoblastos com função alterada, e excesso de produção de TPO, ligante 3 de quimiocina de motivo C-C (CCL3), fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ) e Notch, induzindo assim um estado inflamatório crônico (IWASAKI; SUDA, 2009). A expressão de CXCL12, essencial para uma mobilização controlada das CTHs, é reduzida devido à função alterada dos osteoblastos. As MSCs promovem a expansão anormal de osteoblastos em células inflamatórias mielofibróticas, uma conversão mediada pela desregulação das vias de sinalização inflamatória com excesso de produção de fator de crescimento transformante beta tipo 1 (TGF- $\beta$ 1), Notch, interleucina-6 (IL-6)), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ) e secundária ao contato direto entre as células hematopoéticas clonais nas neoplasias mieloproliferativas, e as MSCs (SCHEPERS; CAMPBELL; PASSEGUÉ, 2015; CURTO-GARCIA; HARRISON; MCLORNAN, 2020).

A superprodução de células inflamatórias mielofibróticas contribui para a fibrose progressiva da medula óssea, observada nos estágios avançados das neoplasias mieloproliferativas (SCHMITT-GRAEFF; NITSCHKE; ZEISER, 2015). Ademais, a

produção excessiva de osteoblastos perpetua a proliferação celular clonal das neoplasias mieloproliferativas (SCHEPERS et al., 2013). Foi demonstrado que as MSCs derivadas de pacientes com NMPs (principalmente PV e TE) apresentam um perfil genético e imunofenotípico alterado em comparação com as MSCs derivadas de doadores saudáveis. Na PV, as MSCs mostraram uma superexpressão de genes envolvidos na diferenciação e migração celular, e expressão diminuída em CXCL12 (RAMOS et al., 2017).

No que diz respeito à MEC, existem níveis aumentados de citocinas e fatores de crescimento, favorecendo tanto o estabelecimento quanto a progressão da doença. Na mielofibrose, há uma deposição intensificada dos componentes da MEC. Assim, o TGF $\beta$ 1 altamente fibrogênico ativa a deposição de fibrose por duas vias principais: enviando a ativação das MSCs em direção à gênese fibroblástica e osteoblástica; e aumentando a produção de colágeno (VANNUCCHI et al., 2005; CURTO-GARCIA; HARRISON; MCLORNAN, 2020).

#### 1.4.4 Policitemia Vera (PV)

A policitemia vera se distingue clinicamente das outras NMPs pela presença de uma massa elevada de eritrócitos. Como o próprio nome sugere, é caracterizada por uma policitemia (aumento importante da hemoglobina), com aumento do hematócrito, do número e do volume dos eritrócitos. Uma produção excessiva de leucócitos e plaquetas também pode estar associada.

A PV pode ocorrer em qualquer idade, e sua incidência aumenta com a idade, sendo a mediana ao diagnóstico 61 anos. A PV é mais frequente em homens que mulheres (TEFFERI; BARBUI, 2020).

Quase todos os pacientes com PV apresentam uma mutação JAK2 (JAK2; 9p24) e aproximadamente 96% e 3% exibem mutações de ativação somática no éxon 14 (JAK2V617F) e no éxon 12 de JAK2, respectivamente (PARDANANI et al., 2007; VANNUCCHI et al., 2008a). As mutações CALR (CALR: 19p13.2) são raras em PV (TEFFERI; PARDANANI, 2015; ELALA et al., 2016; LASHO et al., 2018), assim como as mutações MPL (MPL: 1p34) (BEER et al., 2008; OHASHI et al., 2009; BOYD et al., 2010).

Os pacientes podem ser sintomáticos ou assintomáticos. A maioria dos sintomas é relacionada ao aumento da viscosidade sanguínea. Os sintomas mais comuns incluem eritromelalgia, esplenomegalia, trombose, sangramento, sintomas da microcirculação, prurido e artrite gotosa.

A evolução da PV é lenta, podendo ficar estável por décadas. No entanto, complicações trombo-hemorrágicas podem ocorrer e obscurecer o prognóstico. O risco de trombose é considerado elevado quando o paciente tem mais de 60 anos, com um histórico de trombose.

A sobrevida mediana dos pacientes é de 15 anos, e aumenta para 37 anos para pacientes de 40 anos ou menos no momento do diagnóstico (TEFFERI; BARBUI, 2020).

Existe um risco de transformação leucêmica ou fibrótica da PV (PASSAMONTI et al., 2010). A taxa de transformação leucêmica é estimada em 3% em 10 anos (TEFFERI; BARBUI, 2020).

Na PV, duas categorias de risco de trombose são consideradas. Risco elevado (idade superior a 60 anos ou histórico de trombose existente) e risco baixo (ausência dos fatores de risco). O tratamento é baseado no risco, o principal objetivo sendo prevenir as complicações trombóticas e hemorrágicas. Os pacientes com PV necessitam de uma flebotomia para manter o hematócrito abaixo de 45%. Também podem ser utilizados medicamentos tais como o ácido acetilsalicílico em baixa dose, para reduzir o risco de trombose. Tratamentos citorrredutores, tais como a hidroxiureia, podem ser recomendados em pacientes com risco elevado (TEFFERI; BARBUI, 2020).

#### 1.4.5 Trombocitemia Essencial (TE)

A Trombocitemia essencial é uma NMP caracterizada por uma produção clonal excessiva de plaquetas, mais comum em mulheres, com idade mediana dos pacientes no momento do diagnóstico entre 65-70 anos. A TE pode afetar todas as faixas etárias, mas geralmente é diagnosticada na terceira a quarta década de vida (FABRIS; RANDI, 2009).

A mutação no éxon 14 (JAK2V617F) ocorre na TE com frequência de 50-55%, as mutações do éxon 12 são mais raras (CAMPBELL; GREEN, 2006; LEVINE et al., 2007; TEFFERI; BARBUI, 2020). As mutações CALR (CALR: 19p13.2) ocorrem em 15% - 24% dos pacientes com TE (TEFFERI; PARDANANI, 2015; ELALA et al., 2016; LASHO et al., 2018), e mutações em *MPL* (MPL: 1p34) foram relatadas em cerca de 4% dos pacientes com TE (PARDANANI et al., 2006; PIKMAN et al., 2006; BEER et al., 2008; VANNUCCHI et al., 2008b; OHASHI et al., 2009; BOYD et al., 2010). Além disso, mutações em gene da regulação epigenética como *TET2* ou *ASXL1* foram também observadas em pacientes com TE, positivos ou negativos para a mutação JAK2 V617F (BEER; GREEN, 2009; DELHOMMEAU et al., 2009; TEFFERI et al., 2011; MCPHERSON; MCMULLIN; MILLS, 2017).

Mais da metade dos pacientes são assintomáticos no momento do diagnóstico. As manifestações clínicas são hemorrágicas, trombóticas ou vasomotoras (TEFFERI; BARBUI, 2020). Não foi demonstrado que as mutações iniciadoras afetam a sobrevida de pacientes com TE, mas o risco de trombose é maior em casos com mutação JAK2 (CHEUNG et al., 2006).

Na TE, quatro categorias permitem estratificar o risco de trombose. São elas: risco muito baixo (idade menor ou igual a 60 anos, sem histórico de trombose, JAK2 tipo selvagem), risco baixo (idade menor ou igual a 60 anos, sem histórico de trombose, JAK2 tipo selvagem, mutação JAK2 presente), risco intermediário (idade superior a 60 anos, sem histórico de trombose, JAK2 tipo selvagem) e alto (histórico de trombose presente ou idade superior a 60 anos com mutação JAK2).

A sobrevida mediana é de 18 anos, e pode chegar a 35 anos para pacientes com 40 anos ou menos no momento do diagnóstico. Existe um risco de transformação para mielofibrose e leucemia. A taxa de transformação leucêmica é menor que 1% em 10 anos (TEFFERI; BARBUI, 2020).

O tratamento é baseado na estratificação do risco (muito baixo, baixo, intermediário ou alto) de cada paciente. Os pacientes com risco muito baixo podem não requerer tratamento. As estratégias terapêuticas incluem terapia com ácido acetilsalicílico a partir do risco baixo. O tratamento citorrredutor (hidroxiureia, ou drogas de segunda linha como interferon- $\alpha$  e busulfan) é recomendado para o risco muito alto, porém não obrigatório para o risco intermediário. O objetivo terapêutico é atingir uma contagem de plaquetas inferior a  $400 \times 10^9 / L$ , sem sintomas relacionados com a doença, tamanho normal do baço e contagem de leucócitos de  $10 \times 10^9 / L$  (BAROSI et al., 2009; TEFFERI; BARBUI, 2020).

#### 1.4.6. Mielofibrose Primária (MFP)

A mielofibrose primária é caracterizada por hematopoese ineficiente, hematopoese extramedular, inflamação, mielofibrose e osteosclerose (MUGHAL et al., 2014).

A MFP é a mais rara entre as NMPs. A idade média dos pacientes com MFP no momento do diagnóstico é de aproximadamente 65 anos. No entanto, essa doença pode ser diagnosticada em qualquer idade, mesmo na infância, embora seja muito rara ainda nessa faixa etária. A MFP parece afetar um pouco mais homens que mulheres (CERVANTES et al., 2009; TEFFERI et al., 2012).

A mutação JAK2V617F também ocorre em MFP, com frequência de 65%. As mutações do éxon 12 de JAK2 são raras em MFP (PARDANANI et al., 2007; VANNUCCHI et al.,

2008a). A mutação da calreticulina (CALR: 19p13.2) ocorre em 25%-35% dos pacientes com MFP (TEFFERI; PARDANANI, 2015; ELALA et al., 2016; LASHO et al., 2018). As mutações MPL (MPL: 1p34) ocorrem em aproximadamente 8% dos pacientes com MFP (BEER et al., 2008; OHASHI et al., 2009; BOYD et al., 2010).

A fibrose da medula óssea é a característica patológica central, e o principal critério de diagnóstico segundo a OMS (BARBUI et al., 2018). A deposição da fibrose reticulina e de colágeno na medula óssea de pacientes com MFP é mediada pela célula-tronco hematopoiética/progenitora da mielofibrose, contribuindo para um microambiente prejudicado que favorece a hematopoese maligna em relação à normal. Expressão aberrante de citocinas pró-inflamatórias por células clonais e reação imune do hospedeiro contribuem para alterações estromais da medula óssea, eritropoiese ineficaz, hematopoese extramedular (HEM), caquexia e sintomas constitucionais (ZHR et al., 2016; GANGAT, 2020; TEFFERI, 2021).

As manifestações clínicas na MFP incluem anemia grave, hepatoesplenomegalia marcada, sintomas constitucionais (por exemplo, fadiga, suores noturnos, febre), caquexia, dor óssea, infarto esplênico, prurido, trombose e sangramento (TEFFERI, 2000). Eritropoiese ineficaz e HEM hepatoesplênica são as principais causas de anemia e organomegalia, respectivamente. Outras complicações da doença incluem hipertensão portal sintomática que pode levar a sangramento de varizes ou ascite, e a HEM não hepatoesplênica que pode causar compressão da medula, ascite, derrame pleural, hipertensão pulmonar ou dor difusa nas extremidades (TEFFERI, 2016).

A MFP apresenta alta mortalidade devido ao seu potencial de transformação leucêmica que ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes, mas muitos pacientes também morrem de condições de comorbidade, incluindo eventos cardiovasculares e consequências de citopenias, que incluem infecção, sangramento, trombose (MUGHAL et al., 2014; HULTCRANTZ et al., 2015; KAIFIE et al., 2016; TEFFERI, 2021).

A estratificação do risco para avaliar o prognóstico e guiar a estratégia terapêutica dos pacientes com MFP é atualmente baseada em dois escores: O escore GIPSS (*genetically-inspired prognostic scoring system*) e o escore MIPSS70+ version 2.0 (MIPSSv2; *mutation-and karyotype-enhanced international prognostic scoring system*). O GIPSS, que tem quatro categorias de risco (baixo, intermediário-1, intermediário-2 e alto), é baseado exclusivamente em mutações e alterações citogenéticas do cariótipo. O MIPSSv2, além das mutações e alterações do cariótipo, inclui fatores de risco clínicos e tem cinco categorias de risco: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto (GUGLIELMELLI et al., 2018; TEFFERI et al., 2018a, 2018b; TEFFERI, 2021). A descrição do GIPSS e do MIPSSv2 está no anexo I.

A MFP é uma doença clinicamente mais agressiva do que a PV e a TE. A sobrevida relativa em 5 anos de pacientes com MFP é muito menor do que aqueles com PV ou TE (ROALDSNES et al., 2017). Para pacientes com 70 anos ou menos, e com risco muito alto (MIPSSv2), a sobrevida mediana é 1,8 anos com taxa de sobrevida inferior a 5% (TEFFERI et al., 2018a) . Para os pacientes com risco alto (GIPSS), a sobrevida mediana é de 2 anos (TEFFERI et al., 2018b).

Em relação ao tratamento da MFP, o transplante de células-tronco hematopoéticas é a única estratégia terapêutica curativa capaz de levar a uma resolução da fibrose da medula óssea (ZAHR et al., 2016). A observação por si só é recomendada para os pacientes com risco MIPSSv2 baixo e muito baixo. O transplante alogênico de CTHs é o tratamento recomendado para os pacientes com risco MIPSSv2 muito alto e alto. Em pacientes não transplantados, o tratamento convencional para anemia inclui andrógenos, prednisona, talidomida e danazol; para esplenomegalia sintomática, hidroxíureia e ruxolitinibe; e para sintomas constitucionais, ruxolitinibe ou fedratinibe. A esplenectomia é considerada para esplenomegalia refratária a medicamentos; a radioterapia para hematopoese extramedular não hepatoesplênica e dor nas extremidades dos ossos (TEFFERI, 2021).

#### 1.4.7 Diagnóstico

Os critérios para o diagnóstico das NMPs, propostos pela OMS em 2016 estão apresentados nas tabelas 1 e 2 (ARBER et al., 2016; BARBUI et al., 2018). As NMPs são identificadas de acordo com suas características mais frequentemente encontradas na medula óssea e no sangue periférico. No entanto, algumas características podem ser compartilhadas, devido ao fato de compartilharem as mesmas mutações. O diagnóstico da MFP é mais complexo do que o da PV e da TE, e a OMS recomenda critérios específicos para cada fase da doença. As tabelas 1 e 2 apresentam os critérios diagnósticos da PV e da TE, e da MFP, respectivamente. A figura 5 ilustra as características laboratoriais das 3 doenças.

**Tabela 1** - Critérios diagnósticos da PV, TE e MFP segundo a OMS 2016

<b><sup>4</sup>Policitemia Vera <sup>a</sup></b>		<b>Trombocitemia Essencial <sup>b</sup></b>
<b>Critérios maiores</b>		
1	Hemoglobina > 16,5 g / dL (homens) Hemoglobina > 16,0 g / dL (mulheres) ou Hematócrito > 49% (homens) Hematócrito > 48% (mulheres) ou Aumento da massa eritrocitária <sup>c</sup>	Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9 / L$
2	Biópsia de MO mostrando hiper celularidade para a idade com crescimento das 3 linhagens (panmielose) incluindo proeminente proliferação eritróide, granulocítica e megacariocítica, com megacariócitos pleiomórficos e maduros (diferenças de tamanho).	Biópsia de MO mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariocítica com aumento de megacariócitos maduros e com núcleos hiperlobulados, sem desvio à esquerda significativo de neutrófilos, fibras de reticulina com grau 1 <sup>d</sup>
3	Presença de mutação de JAK2 ou no éxon 12 de JAK2	Não atendendo aos critérios da OMS para BCR-ABL1 + CML, PV, MFP, SMD ou outras neoplasias mielóides
		Presença de mutação de JAK2, MPL ou CALR
<b>Critérios menores</b>		
Nível de eritropoietina sérica subnormal		Presença de um marcador clonal (por exemplo, cariótipo anormal) ou ausência de evidência de trombocitose reativa

Fonte : Adaptado de (ARBER et al., 2016; BARBUI et al., 2018)

**Tabela 2** - Critérios diagnósticos para a mielofibrose primária segundo a OMS 2016

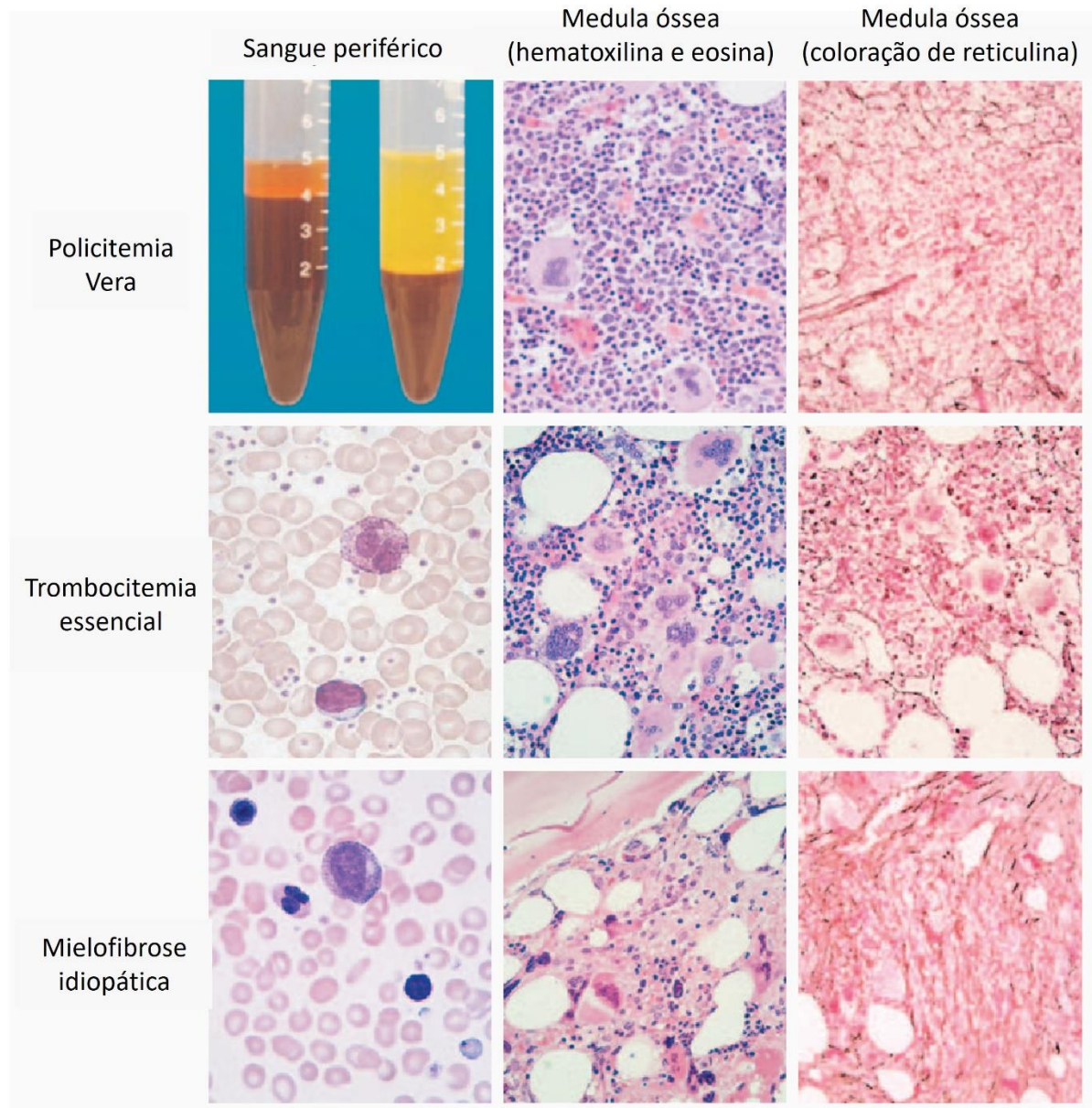
<sup>4 a</sup> O diagnóstico da PV requer o cumprimento de todos os três critérios maiores ou os dois primeiros critérios maiores e um critério menor. <sup>b</sup> O diagnóstico de TE requer o cumprimento de todos os quatro critérios maiores ou os três primeiros critérios maiores um critério menor. <sup>c</sup> Mais de 25% acima do valor predito normal médio. <sup>d</sup> Classificação de fibras da medula óssea (THIELE et al., 2005). O critério número 2 (biópsia da MO) pode não ser necessário em casos com eritrocitose absoluta sustentada: níveis de hemoglobina. 18,5 g / dL em homens (hematócrito, 55,5%) ou 16,5g / dL em mulheres (hematócrito, 49,5%) se o critério principal 3 e o critério secundário estiverem presentes. No entanto, a mielofibrose inicial (presente em até 20% dos pacientes) pode apenas ser detectada pela realização de uma biópsia da MO; este achado pode prever uma progressão mais rápida para mielofibrose (MF pós-PV). BCR-ABL1 + CML: Leucemia mielóide crônica positiva para a BCR/ABL. SMD: síndrome mielodisplásica.



<b><sup>5</sup>Mielofibrose primária <sup>a</sup></b>		
<b>MFP Pre-fibrótica</b>		<b>MFP</b>
<b>Critérios maiores</b>		
1	Proliferação megacariocítica e atipia <sup>b</sup> , sem fibrose reticulina > grau 1 <sup>c</sup> , acompanhada por aumento da celularidade da MO ajustada à idade, proliferação granulocítica e frequentemente diminuição da eritropoiese	Proliferação de megacariócitos e atipia <sup>b</sup> acompanhada por fibrose reticulina e/ou de colágeno (grau 2 ou 3)
2	Não atendendo aos critérios da OMS para BCR-ABL1 + CML, PV, ET, SMD ou outra neoplasia mieloide	Não atendendo aos critérios da OMS para BCR-ABL1 + CML, PV, ET, SMD ou outra neoplasia mieloide
3	Presença de mutação JAK2, CALR ou MPL ou, na ausência dessas mutações, presença de outro marcador clonal <sup>d</sup> ou ausência de fibrose reticulina reativa menor da MO <sup>e</sup>	Presença de mutação JAK2, CALR ou MPL ou, na ausência, presença de outro marcador clonal ou ausência de evidência de fibrose reativa da MO <sup>f</sup>
<b>Critérios menores</b>		
Presença de um ou mais dos seguintes, confirmada em duas determinações consecutivas: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Anemia não atribuída a uma comorbidade</li> <li>– Leucocitose <math>\geq 11 \times 10^9 /L</math></li> <li>– Esplenomegalia palpável</li> <li>– Nível de LDH acima do limite superior da faixa de referência laboratorial</li> </ul>		Presença de um ou mais dos seguintes, confirmada em duas determinações consecutivas: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Anemia não atribuída a uma comorbidade</li> <li>– Leucocitose <math>\geq 11 \times 10^9 /L</math></li> <li>– Esplenomegalia palpável</li> <li>– Nível de LDH acima do limite superior da faixa de referência laboratorial</li> <li>– Leucoeritroblastose</li> </ul>

Fonte : Adaptado de (ARBER et al., 2016; BARBUI et al., 2018)

<sup>5 a</sup> O diagnóstico de MFP pré-fibrótica requer todos os três critérios maiores e pelo menos um critério menor. O diagnóstico de MFP fibrótica requer o cumprimento de todos os três critérios maiores e pelo menos um critério menor. <sup>b</sup> Megacariócitos pequenos a grandes com relação nuclear / citoplasmática aberrante e núcleos hiper cromáticos e irregularmente dobrados e agrupamento denso. <sup>c</sup> Em casos com fibrose de reticulina grau 1 (THIELE et al., 2005), as alterações de megacariócitos devem ser acompanhadas por aumento da celularidade da MO, proliferação granulocítica e, frequentemente diminuição da eritropoiese (isto é, pré-MFP). <sup>d</sup> Na ausência de qualquer uma das três principais mutações clonais, a pesquisa das mutações associadas mais frequentes (ASXL1, EZH2, TET2, IDH1 / IDH2, SRSF2, SF3B1) ajuda a determinar a natureza clonal da doença. <sup>e</sup> Fibrose de reticulina (grau 1) secundária a infecção, distúrbio autoimune ou outras condições inflamatórias crônicas, leucemia de células pilosas ou outra neoplasia linfóide, malignidade metastática ou mielopatias tóxicas (crônicas). <sup>f</sup> Fibrose da MO secundária a infecção, distúrbio autoimune ou outras condições inflamatórias crônicas, leucemia de células pilosas ou outra neoplasia linfóide, metastática malignidade ou mielopatias tóxicas (crônicas). LDH: Lactato-desidrogenase. Leucemia mieloide crônica positiva para a BCR/ABL. SMD: síndrome mielodisplásica.



**Figura 5** - Características laboratoriais de policitemia Vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária .  
**Fonte:** CAMPBELL & GREEN, 2006

<sup>6</sup>A policitemia vera é caracterizada por um hematócrito aumentado no sangue periférico (tubo de ensaio à esquerda); uma medula hiperclular com números aumentados de células precursoras eritróides, megacariocíticas e granulocíticas; e um aumento variável no número de fibras de reticulina. A trombocitemia essencial é caracterizada por um aumento no número de plaquetas no sangue periférico e um aumento no número de megacariócitos na medula, que tendem a se agrupar e apresentar núcleos hiperlobados. A mielofibrose idiopática é caracterizada pela presença de glóbulos vermelhos e brancos imaturos (um esfregaço de sangue leucoeritroblástico) e glóbulos vermelhos em "lágrima", arquitetura celular desordenada, megacariócitos displásicos, nova formação óssea na medula e a formação de fibras de colágeno.

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A ocorrência de NMPs, a exemplo de outras doenças mais comuns em idosos, vêm aumentando no mundo todo, inclusive no Brasil. Acredita-se que este fenômeno seja um reflexo do aumento da expectativa de vida. Os custos com essas doenças são altos para os sistemas de saúde, reforçando a importância de buscar melhores tratamentos e medidas mais específicas para o acompanhamento de cada tipo de NMP.

Existem três tipos de NMPs BCR-ABL negativas, a Policitemia vera, a Trombocitemia Essencial e a Mielofibrose. Embora essas três entidades possuam características específicas, elas compartilham a mutação JAK2V617F e todas têm em comum a presença de altos níveis de inflamação, principalmente devido a elevação da expressão de citocinas inflamatórias. Há diversas evidências vindas principalmente de estudos em modelos animais que demonstraram a contribuição do estroma da medula óssea para o desenvolvimento e manutenção do clone hematopoético nas NMPs. No entanto, a relação inversa, ou seja, a influência do clone alterado sobre o componente estromal da medula óssea, ainda é pouco compreendida.

Assim, foi proposto o rastreamento de moléculas diferencialmente expressas nas células estromais dos diferentes tipos de NMPs, por meio da investigação da expressão gênica e protéica das células mesenquimais estromais obtidas da medula óssea de pacientes com NMPs e controles saudáveis. Adicionalmente, a expressão das moléculas selecionadas foi caracterizada no componente hematopoético, representado por leucócitos totais de sangue periférico do mesmo grupo de indivíduos. Os resultados encontrados poderiam apontar características próprias de cada tipo de NMP, identificando moléculas com função fisiopatológica nessas doenças, que possam ser utilizadas como biomarcadores de diagnóstico, terapia e acompanhamento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Buscar moléculas diferencialmente expressas entre os três tipos principais de NMPs BCR-ABL negativas, Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose, por meio da avaliação da expressão gênica e protéica de células estromais de medula óssea e hematopoéticas de sangue periférico de pacientes com essas neoplasias, comparando as NMPs entre si e com as mesmas células obtidas de indivíduos saudáveis.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a genotipagem dos pacientes com NMPs em relação às mutações JAK2V617F e CALR;
- Realizar análise proteômica de células mesenquimais de pacientes com Policitemia vera e Trombocitemia essencial e, com base nos dados obtidos, selecionar algumas das proteínas diferencialmente expressas e verificar a expressão dos genes codificantes em células mesenquimais de medula óssea e leucócitos totais de sangue periférico, obtidas de amostras de pacientes com os três tipos de NMPs e de controles saudáveis;
- Realizar análises *in silico* de dados disponíveis em bancos públicos acerca da expressão gênica, para seleção de genes diferencialmente expressos na MFP e posterior validação da expressão deles em amostras de células mesenquimais da medula óssea e de leucócitos totais de sangue periférico de pacientes com NMPs e controles saudáveis;
- Verificar a relação entre as moléculas diferencialmente expressas e vias de sinalização celular, em busca de características funcionais de cada tipo de NMP.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES E CONTROLES

Os critérios para a seleção dos pacientes eram suspeita de NMPs, com posterior confirmação do diagnóstico. O critério de exclusão foi não ter sido submetido a nenhum tratamento específico. O grau de fibrose da medula óssea foi determinado utilizando o escore de Bauermister (BAUERMEISTER, 1971) em amostras de biopsia da medula óssea. Os controles foram doadores para transplantes heterólogos, sempre que possível com idade pareada ou semelhante àquela dos casos.

### 4.2 OBTENÇÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS HUMANAS

As MSCs foram obtidas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP); cultivadas e caracterizadas no laboratório da Profa. Fabiola Attié de Castro, na FCFRP-USP. As MSCs foram obtidas por meio de punção de medula óssea de pacientes com PV, TE, MFP e de indivíduos saudáveis (controles). As MSCs controles foram obtidos de excedentes de doadores para transplantes heterólogos.

Todas as MSCs foram expandidas por meio de cultivo *in vitro* em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e incubadas em estufa a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>. As proteínas foram obtidas na terceira passagem. Nesta mesma passagem as MSCs foram caracterizadas quanto à expressão dos marcadores de superfície, expressando os antígenos CD29, CD73, CD90 e CD105, e não expressando os antígenos CD34, CD45, CD14 e HLA-DR. Todas as células foram capazes de se diferenciar em osteócitos e adipócitos.

A diferenciação osteogênica foi induzida pelo cultivo das MSCs em placas com poços de 9 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM suplementado com 10% de SBF, 0,01µM dexametasona, 10mM β-glicerol fosfato, e 0,2mM ácido ascórbico por no mínimo 3 semanas, com troca de meio 2 vezes por semana. Ao fim da diferenciação, foram detectados depósitos de cálcio nas culturas, utilizando a coloração com Vermelho de Alizarina em pH 4,2. Para a diferenciação em adipócitos, as MSCs foram cultivadas em placas com poços de 9 cm<sup>2</sup> em meio DMEM suplementado com 10% de SBF, 0,01µM dexametasona e 5µg/mL de insulina. O cultivo foi feito por 2 a 3 semanas, com troca de meio 2 vezes por semana. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela presença de gotículas de gordura após fixação das células em paraformaldeído 4% seguida de coloração com Oil Red O em isopropanol por 5 minutos.

A aderência ao plástico em condições padrão de cultura, morfologia fibroblastóide, imunofenótipo caracterizado pela expressão das moléculas de superfície CD105, CD73 e CD90, e a ausência de expressão de moléculas de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alpha ou CD19 e HLA-DR, além da diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* são critérios mínimos de identificação das MSCs segundo o trabalho de DOMINICI que apoia as diretrizes da Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006).

### 4.3 DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES EM MSCs

#### 4.3.1 Detecção da mutação JAK2V617F

A detecção da mutação V617F do gene da JAK2 foi feita com o DNA das amostras de leucócitos dos pacientes. O DNA foi extraído com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) e a determinação da porcentagem de alelos mutados foram feitas pelo laboratório de referência Fleury Medicina e Saúde pela técnica de discriminação alélica utilizando PCR em tempo real, a pedido da colaboradora Prof. Fabiola Attié de Castro. O ensaio utilizou duas sondas marcadas com fluorescência e do tipo MGB (*minor groove binder*) para detecção da mutação G→T no éxon 14 do gene JAK2. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (*Forward*: 5'-GCAGCAAGTATGATGAGCAAGCT-3' e *Reverse*: 5'-GCATTAGAAAGCCTGTAGTTTTACTTAC-3') e das sondas MGB foram desenhadas utilizando-se o software Primer Express®, versão 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sondas de hibridação foram desenhadas com dois diferentes fluorocromos para permitir a discriminação alélica em um único tubo. Uma delas continha FAM (6-carboxifluoresceína) e tinha como alvo o alelo selvagem (5'-6-FAM-TGGAGTATGTGTCTGTGGA-3') e a outra para o alelo mutante tinha como fluorocromo o reporter VIC (6-carboxyrhodamine 6G) (5' -VIC-TGGAGTATGTTTCTGTGGAG -3'). Os oligonucleotídeos foram sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) e as sondas foram sintetizadas pela Applied Biosystems. A amplificação por PCR em tempo real foi feita utilizando-se o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em uma reação com volume de 12,5 µL contendo 0,3 µM de cada primer, 0,2 µM de cada sonda e DNA. O ciclo utilizado foi: 50°C por 2 minutos para ativação da Uracil-N-Glicosilase (UNG), 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15

segundos e 60°C por 1 minuto no equipamento Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). Cada ensaio de PCR incluiu um controle negativo.

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

#### 4.3.2 Detecção da mutação CALR

A pesquisa de mutações indel, caracterizada por inserções ou deleções no éxon 9 do gene da calreticulina (CALR), foi realizada de acordo com Chi e colaboradores (CHI et al., 2014), no DNA obtido de leucócitos, baseadas em uma reação de PCR e posterior sequenciamento por análise de fragmentos.

Para a reação de PCR, foi utilizado como template 100 ng de DNA para volume final de 30  $\mu$ L, no qual foram adicionados 3  $\mu$ L de solução-tampão (10X); 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 1,5 $\mu$ L de DMSO; 2 $\mu$ L de dNTP (10 mM); 0,3  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L), 0,3 $\mu$ L a 10 $\mu$ M dos iniciadores sense (5'-TAACAAAGGTGAGGCCTGGT-3'(6-FAM-labeled)) e antisense (5'-GCCTCTCTACAGCTCGTCCTT-3'). O primer sense é marcado com a sonda fluorescente 6-FAM, o que possibilitou a posterior análise dos fragmentos por sequenciamento. As condições de termociclagem foram: 10 minutos de desnaturação a 94°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e uma etapa final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, os produtos foram aplicados em gel de agarose 4% e analisados. Alelos selvagens apresentam bandas com 297 pares de base (pb), enquanto que bandas de 245 pb indicam a mutação do Tipo 1, caracterizado pela deleção de 52 pb e, bandas de 302 pb indicam a mutação do Tipo 2, correspondente da inserção de 5pb. Devido ao pequeno número de pares de bases que diferenciam as bandas selvagens e mutadas foi necessário a análise de fragmentos por sequenciamento em equipamento ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Life Technologies) e os resultados analisados pelo Software do próprio sequenciador.

#### 4.4 ANÁLISE DE PROTEÔMICA

A análise de proteômica de MSCs de NMPs foi escolhida porque não foram encontrados dados desse tipo na literatura. Por outro lado, já existem relatos na literatura de análises de proteômica de NMPs obtidas a partir de células do componente hematopoético, como descrito por Tognon e colaboradores (TOGNON et al., 2020), Federici e colaboradores (FEDERICI et al., 2019) e Fel e colaboradores (FEL et al., 2019).

O extrato protéico foi obtido a partir das MSCs na passagem 3 de cultivo, no laboratório da Profa. Fabiola Attié de Castro, na FCFRP-USP. As células foram lavadas com o tampão fosfato (PBS) e submetidas à lise celular com tampão contendo SDS 4%, DTT 0,1 M, Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 e inibidor de proteases. O sobrenadante do lisado foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e depois enviado em gelo seco para o Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná), onde foi realizada a análise proteômica.

O lisado proteico foi então dosado por método de triptofano (WIŚNIEWSKI; GAUGAZ, 2015). Brevemente, o material foi dissolvido em ureia 8M contendo Tris-HCl 0,1M em pH 7,8 e o conteúdo de triptofano foi determinado por espectrometria com excitação em 295nm e emissão em 350nm, com ganho de 100, altura de 7mm, na posição ótica, sendo obtidas 5 leituras de cada ponto. Com a dosagem em mãos, 20  $\mu\text{g}$  do lisado proteico foi aplicado em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 10%) corados com Coomassie. A banda foi recortada do gel, colocada em tubos de polipropileno de 1,5 mL e descorada com solução de bicarbonato de amônio 25 mmol L<sup>-1</sup> em etanol 50% em quantidade suficiente para cobrir o gel. Esses tubos são agitados em thermomixer por no mínimo 10 minutos a 25 °C (800 rpm) ou até que a solução fique saturada. O sobrenadante foi retirado e descartado e o procedimento repetido até que o gel estiver totalmente descorado.

Em seguida veio a etapa de desidratação, feita adicionando etanol absoluto em volume suficiente para cobrir bem os pedaços de gel e agitando os tubos em thermomixer por 10 min a 25 °C (800 rpm). O sobrenadante foi descartado e o procedimento de desidratação repetido mais uma vez ou mais, até que os pedaços de gel ficassem endurecidos e brancos. Os pedaços de gel foram então submetidos à secagem em speed-vac por 7 min (vacuum pressure = 0,1) até que ficassem bem secos e “soltos” dentro do tubo. Em seguida foi adicionado tampão de redução (solução de DTT 10 mmol L<sup>-1</sup> em ABC 50 mmol L<sup>-1</sup>) em quantidade suficiente para cobrir os pedaços de gel, seguida de incubação no thermomixer por 60 minutos a 56 °C (800 rpm). Foi descartado todo sobrenadante (esta etapa promove a quebra das pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína) e adicionado o tampão de alquilação (solução de Iodoacetamida 55 mmol L<sup>-1</sup> em



ABC 50 mmol L<sup>-1</sup>) até cobrir os pedaços de gel, seguida de incubação no thermomixer por 45 min a 25 °C (800 rpm) protegido da luz. Depois disso, o líquido foi descartado. O tampão de digestão (Solução aquosa de ABC 50 mmol L<sup>-1</sup>) foi adicionado até cobrir os pedaços de gel e a amostra incubada no thermomixer por 20 min a 25 °C (800 rpm).

Em seguida o sobrenadante foi descartado. Os géis foram então desidratados novamente com etanol absoluto mais duas vezes e depois foi feita a secagem, de forma idêntica à descrita anteriormente. Aos géis secos, foi adicionada a solução de tripsina 12,5 ng µL<sup>-1</sup> diluída com solução ABC 50 mmol L<sup>-1</sup> no momento do uso, de forma a cobrir os géis a fim de hidratá-los completamente. Gel foi incubado assim na geladeira (4 °C) por 20 minutos. O excesso da solução de tripsina (se houver) foi removido e descartado. Em seguida o tampão de digestão foi adicionado em quantidade suficiente para cobrir os pedaços de gel e a amostra foi incubada em estufa a 37 °C entre 16 e 18 horas. Após 16 -18 horas, todo o líquido foi coletado em tubos novos e a solução de extração (Água, TFA 3%, acetonitrila 30%) foi adicionada em quantidade suficiente para cobrir o gel, mas sem ultrapassar 400 µL. A amostra foi agitada no thermomixer por 10 minutos a 25 °C (800 rpm).

Em seguida foi coletado novamente o sobrenadante transferindo-o para o tubo de 2,0 mL. Essa etapa foi repetida. Acetonitrila foi adicionada até cobrir os pedaços de gel e a amostra agitada no thermomixer por 10 minutos a 25°C (800 rpm). Transferir o sobrenadante para o tubo de 2,0 mL e repetir essa etapa mais uma vez. Um spin antes da última coleta foi dado a fim de recuperar todo o líquido, e a amostra (sobrenadante) é secada em speed-vac até 10 a 20% do volume original para remover a acetonitrila. Os peptídeos foram purificados usando StageTips-C18. Para fabricação de StageTip-C18, um disco de membrana C18 (3M Empore™) foi colocado sobre uma superfície plana e limpa, como uma placa de Petri de plástico ou vidro e a membrana C18 foi perfurada com dispositivo apropriado, retirando uma pequena porção. Esta porção foi transferida para um tip (2-200 µL) e o procedimento foi repetido colocando outra porção de membrana C18 sobre a anterior. O StageTip foi acoplado ao adaptador (tubo de 1,5 mL com o fundo e a parte superior cortados) e ao tubo de lavagem (tubo de 2,0 mL sem tampa) e 100 µL de metanol (grau LC-MS) foram adicionados ao StageTip para condicioná-lo.

Em seguida a amostra é centrifugada a 1.000 x g por 2 min. O metanol foi descartado e o StageTip equilibrado duas vezes com 100 µL de solução A (água; ácido fórmico 0,1%), centrifugando a 1.000 x g por 4 min em cada vez. A amostra foi colocada no StageTip (não mais que 200 µL) e centrifugada a 1.000 x g pelo tempo necessário para que todo o volume passe pelo tip (aproximadamente 5 min). Em seguida, o StageTip foi lavado duas vezes com

200  $\mu$ L de solução A centrifugando a 1.000 x g por 6 min cada vez. A eluição foi feita acoplando-se o StageTip ao adaptador e ao tubo de lavagem e lavando o mesmo duas vezes com 200  $\mu$ L de solução A centrifugando a 1.000 x g por 6 min. O adaptador foi acoplado com o StageTip em um tubo (eppendorf) limpo de 1,5 mL e prosseguiu-se com a eluição dos peptídeos, passando 20  $\mu$ L duas vezes (40  $\mu$ L final) de solução E (ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 40%) armazenada na geladeira. A amostra foi centrifugada a 1.000 x g por 1 min para cada 20  $\mu$ L.

Em seguida, a amostra foi submetida à secagem em speed vac por 30 min sem aquecimento, (vacuum pressure = 0,1) para remover o acetonitrila e depois diluída em solução AD (ácido fórmico 0,1%, DMSO 5%, acetonitrila 5%) de acordo com a massa total que se deseja injetar no espectrômetro de massas. Assim está pronta para análise por LC-MS/MS. O equipamento é um Cromatógrafo líquido Ultimate 3000, marca Thermo (com gradiente: Fase A: 0,1% de ácido fórmico, 5% DMSO; Fase B: 0,1% de ácido fórmico, 5% DMSO em acetonitrilo) e fluxo de 250 nL/min, com gradiente linear de 5 a 40% da fase B em 120 min. A coluna analítica de 15 cm com 75  $\mu$ m de diâmetro interno, contendo partículas de C18 de 3 micrometros de diâmetro. A espectrometria de massas é feita em equipamento espectrômetro de massas híbrido LTQ Orbitrap XL ETD, marca Thermo Scientific Full Scan (MS1) com parâmetros: janela full scan (m/z): 300.0-2000.0, resolution of 60000, lock Mass: 401.922718 m/z.

#### 4.5 ANÁLISES *IN SILICO*

Os dados disponíveis do GEO foram analisados diretamente no website do NCBI, por meio da ferramenta GEO2R, sempre comparando dois grupos de amostras. Os resultados são apresentados em forma de tabelas contendo os genes com expressão diferencial, na ordem de maior significância na diferença de expressão. Também são demonstrados alguns gráficos contendo estes mesmos dados, sendo o principal deles o Volcano Plot. Os pacotes GEOquery e limma R do projeto Bioconductor compõem a metodologia de análise do GEO2R. Estes pacotes usam os testes mais amplamente aceitos e utilizados para identificar genes diferencialmente expressos, aplicando testes múltiplos de correção do valor de p para ajudar a minimizar a ocorrência de falsos positivos.

O resultado da análise mostra sempre tabelas de genes com suas respectivas diferenças de expressão (genericamente denominadas razões ou fold change) e valor de p de acordo com o teste de diferença de expressão entre os grupos analisados. É gerada uma tabela de 250 genes

com maiores diferenças de expressão entre as duas amostras comparadas, uma tabela com todos os genes analisados e seus valores de expressão e alguns gráficos, entre os quais o Volcano Plot, que demonstra tanto os valores de fold change quanto os valores de p (em  $-\log_{10}$ ), dando destaque aos genes regulados positivamente e negativamente entre as amostras analisadas. Foram analisados dados públicos de expressão gênica depositados no GEO (Gene Expression Omnibus, [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)), com objetivo de selecionar genes diferencialmente expressos nas NMPs. A busca foi feita no GEO com palavras-chave: neoplasias mieloproliferativas, mielofibrose, trombocitemia essencial e Policitemia vera, células mesenquimais, células hematopoéticas, sangue total, medula óssea e leucócitos.

Os estudos selecionados foram analisados com a ferramenta interativa GEO2R, fornecida pelo próprio GEO, que compara dois ou mais grupos de amostras, sendo os resultados apresentados em ordem de significância em uma tabela e em forma de gráficos. O GEO2R faz a comparação usando os pacotes de R GEOquery e limma do projeto Bioconductor. O pacote GEOquery R analisa os dados do GEO em estruturas de R. O pacote R limma (Linear Models for Microarray Analysis) é um teste estatístico para identificar genes diferencialmente expressos aplicando correções de múltiplos testes nos valores de p para corrigir a ocorrência de falsos positivos.

#### 4.6 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total foi extraído do pellet das MSCs cultivadas ou do buffy coat no caso dos leucócitos totais de sangue periférico, utilizando o reagente Trizol segundo as especificações do fabricante (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA).

O RNA foi quantificado por método fluorimétrico, seguido da análise de qualidade em equipamento BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

#### 4.7 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

A análise da expressão gênica em MSCs e leucócitos do sangue periférico foi feita por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) com primers e sondas específicos, duplamente marcadas (TaqMan) para genes candidatos, que codificam proteínas relacionadas selecionados a partir da análise de proteômica no caso da PV e TE, e segundo a análise em sílico no caso da PMF.

Os primers e sondas utilizados estão apresentados no Anexo II.

O template utilizado foi o RNA convertido em cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, segundo as instruções do fabricante (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA). O cDNA diluído 1:10 foi utilizado para verificar a expressão dos genes com as sondas TaqMan específicas, utilizando o método relativo de  $2^{-dCt}$  (WU et al., 2007), considerando a média geométrica de pelo menos 2 controles endógenos (ACTB e HPRT) para normalização.

#### 4.8 ANÁLISE DE VIAS DE SINALIZAÇÃO

Os dados da espectrometria de massas, após normalização com o software Perseus foram usados para a análise de vias de sinalização utilizando a ferramenta MetaCore (Cortellis, Clarivate). Essa ferramenta fornece uma análise funcional que identifica as vias de sinalização, redes e processos celulares de acordo com as proteínas diferencialmente expressas encontradas. Os dados foram analisados quanto às vias de sinalização, redes de processos e ativação de ligantes e receptores.

#### 4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas e os gráficos construídos foram realizados utilizando os softwares Graph Pad Prism versão 6.01, e Excel for Microsoft 365.

O teste não paramétrico de análise de variação (teste Kruskal-Wallis) foi utilizado para comparar os valores médios das variáveis contínuas entre as diferentes condições experimentais, assim como o pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação entre dois grupos. O nível de significância foi fixado a um valor p menor que 0,05.

Para a análise dos dados de proteômica, foi utilizado o software Perseus, de acordo com as instruções do fabricante. De forma breve, a intensidade de fluorescência detectada no equipamento de espectrometria de massas é normalizada, valores que não foram detectados em nenhuma amostra de um grupo foram eliminados e foi feito um teste t para comparação de grupos de duas amostras por vez (TYANOVA et al., 2016).

#### 4.10 ASPECTOS ÉTICOS

Para obtenção das amostras de pacientes com NMPs, contamos com a valiosa colaboração da Prof<sup>ª</sup>. Fabiola Attié de Castro, que inseriu o presente estudo como emenda ao projeto coordenado por ela e intitulado “EXPRESSÃO DE APOPTOMIRS EM MICROVESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS”. Este projeto foi aprovado sob o número 55545716.6.0000.5403, pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelos pacientes e doadores saudáveis que aceitaram participar. O projeto foi formulado de acordo com uma resolução do Conselho Nacional de Saúde - CNS 466/12.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS E GENOTIPAGEM DOS PACIENTES

Amostras de medula óssea e de sangue periférico, provenientes de 43 pacientes com NMPs, sendo 14 (32,56%) com PV, 16 (37,21%) com TE, 13 (30,23%) com MFP e de 15 controles (doadores saudáveis) foram analisadas.

A idade média dos indivíduos foi de  $62,21 \pm 12,5$  anos;  $60,31 \pm 13,53$  anos;  $63,62 \pm 12,11$  anos e  $55,80 \pm 18,83$  anos, respectivamente par PV, TE, MFP e o grupo controle.

Todos os pacientes com PV tinham a mutação JAK2V617F. A proporção de pacientes sem nenhuma das mutações JAK2V617F e CALR foi de 31,25% para a TE e de 15,38% para a MFP.

Os pacientes que não estavam em uso de medicação representavam 78,57% dos casos de PV, 93,75% dos casos de TE e 100% dos casos de MFP.

O tratamento era ácido acetilsalicílico para 66,66% (2/3) dos casos de PV tratados; e hidroxiureia para um paciente, 33,33%. O único paciente com TE em tratamento usava o ácido acetilsalicílico e a hidroxiureia.

Pelo menos um evento trombótico (antes ou no decorrer do tratamento) ocorreu em 37,5% dos pacientes com TE.

Os dados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Características e genotipagem dos pacientes com PV, TE ou MFP

Parâmetros	PV (n=14)	TE (n=16)	MFP (n=13)
<b>Mutações</b>			
<b>JAK2V617F +</b>	14 (100%)	9 (56,25%)	7 (53,85%)
<b>CALR +</b>	0 (0%)	2 (12,25%)	3 (23,08%)
<b>Gênero</b>			
<b>Feminino</b>	6 (42,86%)	10 (62,5%)	3 (23,08%)
<b>Masculino</b>	8 (57,14%)	6 (37,5%)	10 (76,92%)
<b>Tratamento</b>			
<b>Sim</b>	3 (21,43%)	1 (6,25%)	0 (0%)
<b>Não</b>	11 (78,57%)	15 (97,75%)	13 (100%)
<b>Risco</b>			
<b>Muito baixo</b>	SI	3 (18,75%)	SI
<b>Baixo</b>	2 (14,28%)	3 (18,75%)	0 (0%)
<b>Intermediário</b>	SI	3 (18,75%)	SI
<b>Intermediário 1</b>	SI	SI	3 (23,08%)
<b>Intermediário 2</b>	SI	SI	10 (76,92%)
<b>Alto</b>	4 (28,57%)	7 (43,75%)	0 (0%)
<b>Eventos trombóticos</b>	3 (21,43%)	6 (37,5%)	1 (7,69%)
<b>Grau de fibrose</b>			
<b>0</b>	5 (31,71%)	13 (81,25%)	1 (7,69%)
<b>1</b>	3 (21,43%)	2 (12,5)	1 (7,69%)
<b>2</b>	1 (7,14%)	1 (6,25)	1 (7,69%)
<b>3</b>	2 (14,28%)	0 (0%)	8 (61,54%)
<b>4</b>	1 (7,14%)	0 (0%)	2 (15,38)
<b>ND</b>	2 (14,28%)	0 (0%)	0 (0%)

<sup>7</sup>Fonte: (GANGAT et al., 2011; BAUERMEISTER, 1971)).

<sup>7</sup> SI: Sem informação. ND: não definido. Score DIPSS (Dynamic International Prognostic Scoring System)-Plus utilizado para a estratificação do risco na MFP (GANGAT et al., 2011).  
Score de Bauermeister para a classificação do grau de fibrose (BAUERMEISTER, 1971)

## 5.2 ANÁLISE DE PROTEÔMICA

### 5.2.1 Proteínas diferencialmente expressas em MSCs de PV e de TE

A análise de proteômica foi feita a partir do extrato proteico de MSCs de pacientes com PV, TE com a mutação JAK2V617F e controles saudáveis. As amostras de MSCs de MFP apresentaram pouco crescimento no cultivo e, portanto, não foi possível obter quantidade suficiente de células para o isolamento de proteínas. Os dados resultantes da espectrometria de massas foram normalizados e analisados de duas maneiras, uma mais estridente, com o pacote R; e outra menos estridente, utilizando o software Perseus.

Com o software Perseus, foram encontradas 73 proteínas diferencialmente expressas ( $p < 0,05$ ) nas MSCs de pacientes com Trombocitemia Essencial (TE) comparadas com MSCs de indivíduos saudáveis (Controles, CT) (Apêndice I). Em relação às MSCs da Policitemia Vera (PV), o número de proteínas diferencialmente expressas ( $p < 0,05$ ) em comparação com as MSCs de indivíduos saudáveis (Controles, CT) foi de 105 (Apêndice II). As 10 proteínas com maior diferença de expressão estão demonstradas nas tabelas 4 e 5, respectivamente para PV e TE.

Quando utilizamos o pacote R para uma análise mais estridente, obtivemos 7 proteínas diferencialmente expressas na análise de MSCs de PV (PV-MS) versus MSCs de controles saudáveis (CTRL-MS), sendo as proteínas VPS26A, CTTN, MAP4, TPD52L2, FAM175B, BAX reguladas positivamente, e a proteína TNC regulada negativamente. Na TE, 5 proteínas foram diferencialmente expressas na análise de MSCs de TE (TE-MS) versus CTRL-MS, sendo as proteínas ALDH1A3, PON2, SCP2 reguladas positivamente e as proteínas RAB21 e RANBP1 reguladas negativamente. A figura 6 mostra esses dados em forma de Volcano Plots.



**Tabela 4** - Top 10 das proteínas com maior diferença de expressão na PV em relação aos controles saudáveis, de acordo com a análise no Perseus

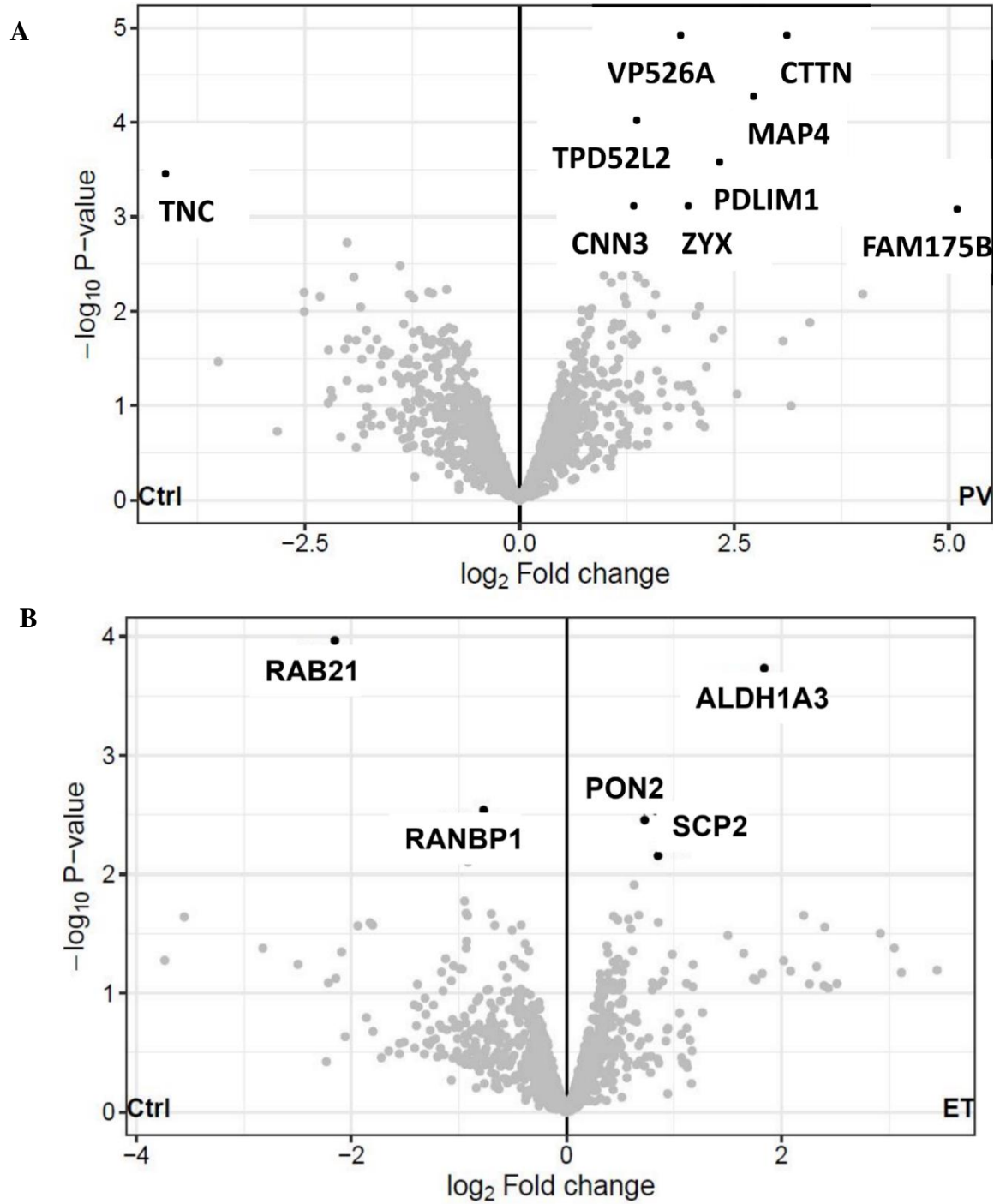
<b>Proteínas reguladas positivamente</b>	<b>Log Razão PV/CT</b>	<b>Proteínas reguladas negativamente</b>	<b>Log Razão PV/CT</b>
CTTN	1,12	RPL15	-1,02
PDLIM1	1,12	MATR3	-1,02
MAP4	1,11	SFPQ	-1,02
CALD1	1,11	RPL3	-1,02
MARCKS	1,09	PRPF19	-1,07
TPD52L2	1,08	RPL26	-1,07
ZYX	1,08	RPL13A	-1,09
CAP2	1,07	DHX9	-1,09
PSAP	1,07	TGFB1	-1,09
EIF4H	1,07	TNC	-1,22

Fonte: Elaborado pela autora

**Tabela 5** - Top 10 das proteínas com maior diferença de expressão em TE em relação aos controles saudáveis, de acordo com a análise no Perseus

<b>Proteínas reguladas positivamente</b>	<b>Log Razão TE/CT</b>	<b>Proteínas reguladas negativamente</b>	<b>Log Razão TE/CT</b>
BCL2L13	1,05	GBP1	-1,01
MOAT7	1,04	ILK	-1,01
STAT1	1,04	NAMPT	-1,01
SERPINE1	1,04	CAP1	-1,01
POFUT1	1,03	RAC1	-1,02
PON2	1,03	ANP32E	-1,03
ASAH1	1,03	HMGB1	-1,03
PRKCDBP	1,03	RANBP1	-1,03
PKM	1,03	LMCD1	-1,04
IKBIP	1,03	PDGFRB	-1,06

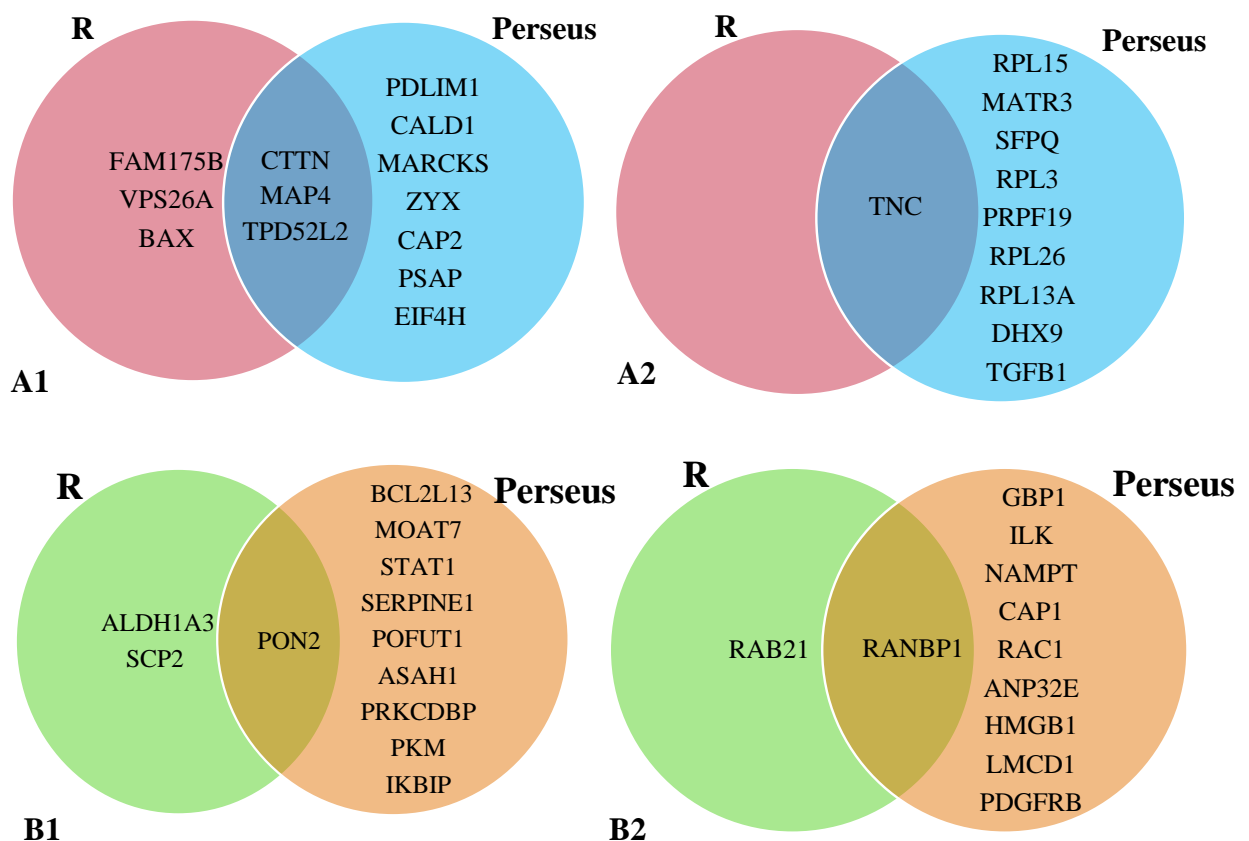
Fonte: Elaborado pela autora



**<sup>8</sup>Figura 6** - Proteínas diferencialmente expressas nas NMPs de acordo com a análise utilizando R.  
**Fonte:** Elaborado pela autora

<sup>8</sup> A) Volcano Plot mostrando as proteínas diferencialmente expressas em MSCs de PV comparadas a MSCs de controles saudáveis;  
 B) Volcano Plot mostrando as proteínas diferencialmente expressas em MSCs de TE comparadas a MSCs de controles saudáveis <sup>8</sup>

Quando cruzamos os dados gerados pelas duas estratégias de análise, Perseus e R, obtivemos em comum algumas proteínas diferencialmente expressas na comparação PV-MSc versus CTRL-MSc, que foram CTTN, MAP4, TPD52L2. O mesmo foi feito para a comparação de TE-MSc com CTRL-MSc, obtendo-se as proteínas diferencialmente expressas em comum, PON2 e RANBP1 (Figura 7).



<sup>9</sup>Figura 7 - Proteínas em comum nas análises com os dois softwares, Perseus e R

Fonte: Elaborado pela autora

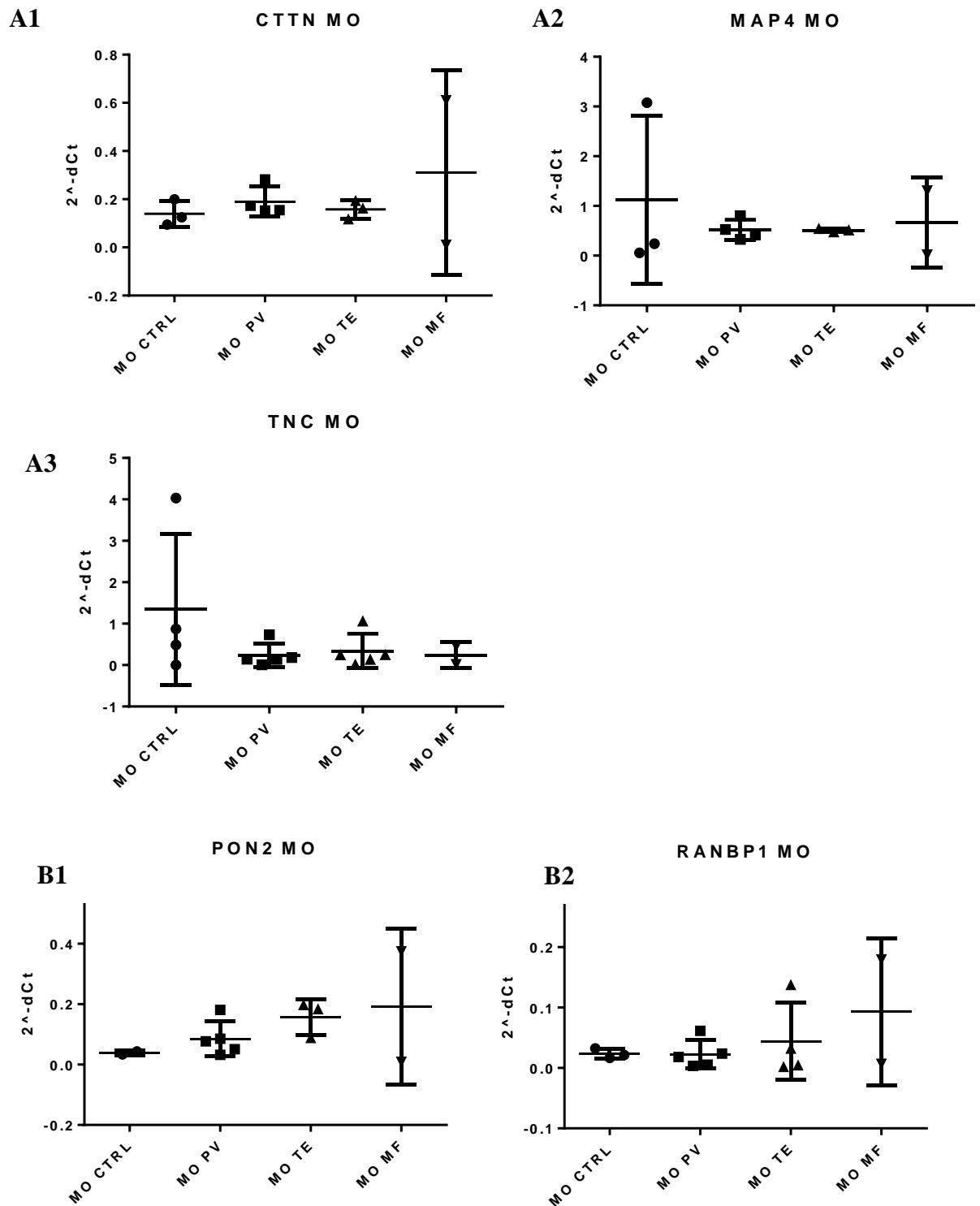
### 5.2.2 Validação dos genes que codificam as proteínas diferencialmente expressas em MSCs da medula óssea

As proteínas diferencialmente expressas em comum nos resultados das duas análises (pacote R e Perseus) foram CTTN, MAP4, TPD52L2 e TNC para PV; PON2 e RANBP1 para TE. Estas proteínas foram selecionadas como potenciais candidatos para diferenciar as NMP e

<sup>9</sup> A1: Proteínas reguladas positivamente na PV. A2: Proteínas reguladas negativamente na PV. B1: Proteínas reguladas positivamente na TE. B2: Proteínas reguladas negativamente na TE.

assim, foram submetidos à validação da sua expressão em um número maior de amostras de pacientes, já que a análise de proteômica foi realizada com 4 amostras de cada grupo. Esse número reduzido foi necessário devido à quantidade elevada de células necessárias para obtenção de extratos proteicos. Assim, como não dispúnhamos de extratos proteicos de todas as amostras, optou-se pela validação com base na expressão dos genes que codificam essas proteínas, por meio da análise por PCR em tempo real do RNA isolado a partir das MSCs de medula óssea e leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV, TE e MFP e controles saudáveis.

Nas MSCs de medula óssea, não houve diferenças significativas na expressão de nenhum dos genes analisados, CTTN, MAP4, TNC, PON2, RANBP1 entre as NMPs em relação ao grupo de controles saudáveis. Os dados estão apresentados na figura 8.

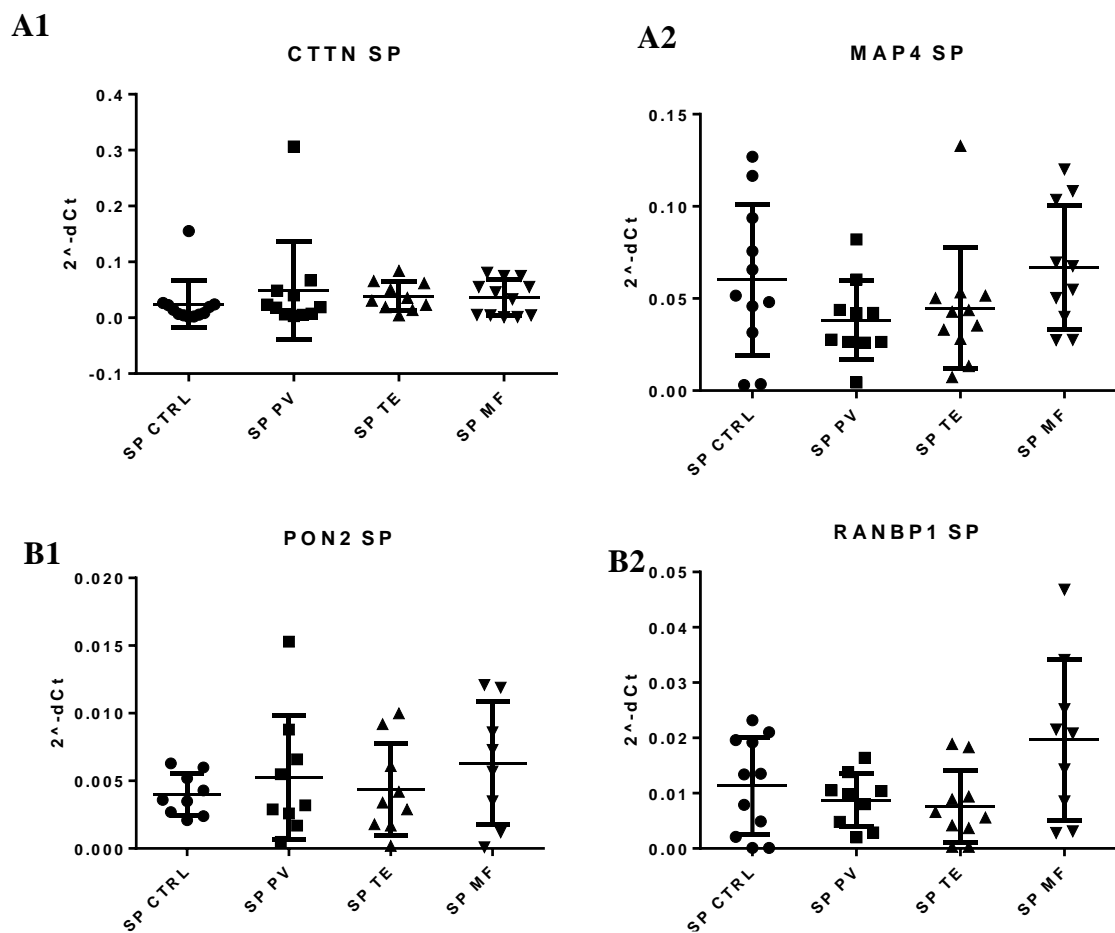


<sup>10</sup>**Figura 8** - Expressão dos genes que codificam as proteínas diferencialmente reguladas  
**Fonte:** Elaborado pela Autora

<sup>10</sup> A. Genes codificando proteínas diferencialmente reguladas na PV. A1. Expressão de CTTN; A2. Expressão de MAP4. A3. Expressão de TNC. B. Genes codificando proteínas diferencialmente reguladas na TE. B1. Expressão de PON2. B2. Expressão de RANBP1. MO CTRL: MSCs da medula óssea de controles saudáveis, n=. MO PV: MSCs da medula óssea de pacientes com PV. MO TE: MSCs da medula óssea de pacientes com TE. MO MF: MSCs da medula óssea de pacientes com MFP.

### 5.2.3 Validação dos genes que codificam as proteínas diferencialmente expressas em leucócitos do sangue periférico

Da mesma forma, os genes que codificam as proteínas encontradas em comum nas análises com o pacote R e o Perseus (CTTN, MAP4, TNC para PV; PON2 e RANBP1 para TE) tiveram suas expressões verificadas em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV, TE e MFP, além de controles saudáveis. O gene TNC expressou níveis muito baixos, não sendo possível realizar análises estatísticas. Os dados de expressão dos demais genes estão apresentados na figura 9. Não houve diferença significativa na expressão destes genes na análise de comparação entre os quatro grupos.



<sup>11</sup>Figura 9 - Expressão em leucócitos do sangue periférico dos genes que codificam as proteínas diferencialmente expressas.

Fonte: Elaborado pela Autora

<sup>11</sup> A. Genes codificando proteínas diferencialmente reguladas na PV. A1. Expressão de CTTN; A2. Expressão de MAP4. B. Genes codificando proteínas diferencialmente reguladas na TE. B1. Expressão de PON2. B2. Expressão de RANBP1. SP: Sangue periférico. SP CTRL: leucócitos do sangue periférico de controles saudáveis. SP PV: leucócitos do sangue periférico de pacientes com PV. SP TE: leucócitos do sangue periférico de pacientes com TE. SP MF: leucócitos do sangue periférico de pacientes com MFP.

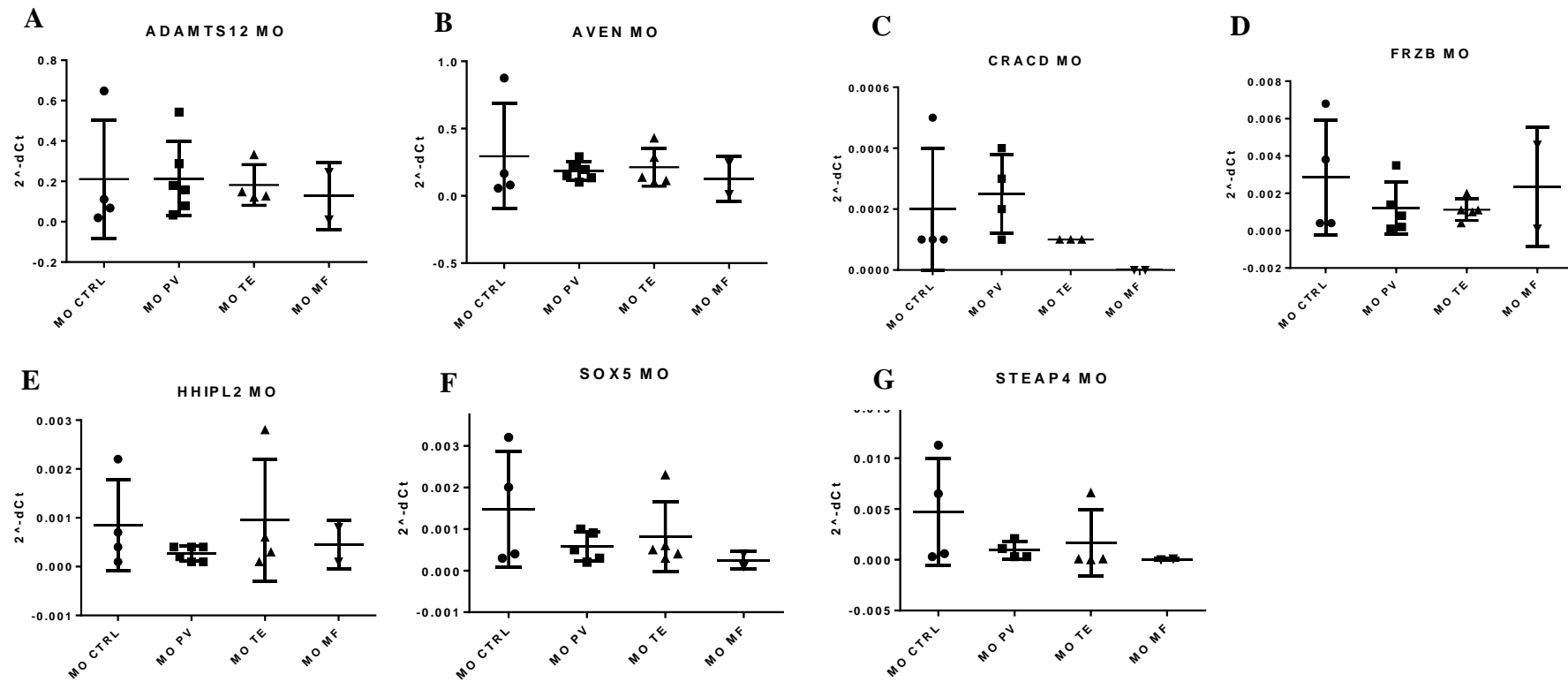
### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MSCs DE MIELOFIBROSE POR MEIO DE ANÁLISE *IN SILICO*

Como não foi possível obter extratos proteicos de MSCs de pacientes com MFP em quantidade suficiente para a análise proteômica, utilizamos dados públicos de expressão gênica depositados no GEO. O dado que encontramos foi do GSE 44426 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44426>) que identificou genes diferencialmente expressos em MSC-MFP versus MSC-Controles saudáveis. Os genes com maior diferença de expressão de acordo com o volcano plot gerado pelo GSE44426 estão na no Apêndice III.

Para validação, foram selecionados os genes *ADAMTS12*, *AVEN*, *CRACD*, *FRZB*, *HAND2-AS1* e *HAND2 HHIPL2*, *SOX5* e *STEAP4*, com base na diferença de expressão e em possível envolvimento na fisiopatologia da MFP de acordo com a literatura. A análise foi feita tanto em MSCs e em leucócitos de sangue periférico de pacientes com as três NMPs.

#### 5.3.1 Expressão gênica em MSCs da medula óssea

Nas MSCs da medula óssea, não foi encontrada diferença significativa na expressão dos genes *ADAMTS12*, *AVEN*, *CRACD*, *FRZB*, *HHIPL2*, *SOX5*, *STEAP4*, na análise de comparação dos quatro grupos PV, TE, MFP e controles saudáveis (Figura 10). Os genes, *HAND2-AS1* e *HAND2* não alcançaram níveis de expressão detectáveis em nenhuma das amostras de MSCs de medula óssea analisadas e, portanto, os dados não foram demonstrados neste documento.



<sup>12</sup>Figura 10 - Expressão gênica nas MSCs da medula óssea em PV, TE, MFP e controles saudáveis

Fonte: Elaborado pela Autora

<sup>12</sup> A. Expressão de ADAMTS12. B. Expressão de AVEN. C. Expressão de CRACD. D. Expressão de FRZB. E. Expressão de HHIPL2. F. Expressão de SOX5. G. Expressão de STEAP4. MO CTRL: MSCs da medula óssea de controles saudáveis. MO PV: MSCs da medula óssea de pacientes com PV. MO TE: MSCs da medula óssea de pacientes com TE. MO MF: MSCs da medula óssea de pacientes com MFP



### 5.3.2 Análise em leucócitos do sangue periférico

No sangue periférico, a expressão dos diferentes genes avaliados está apresentada na figura 11. A expressão do gene *AVEN* mostrou uma diferença significativa ( $p=0,0016$ ) na comparação dos quatro grupos (PV, TE, MFP e controles saudáveis), sendo significativamente menor em todas as NMPs em relação ao grupo de controles saudáveis.

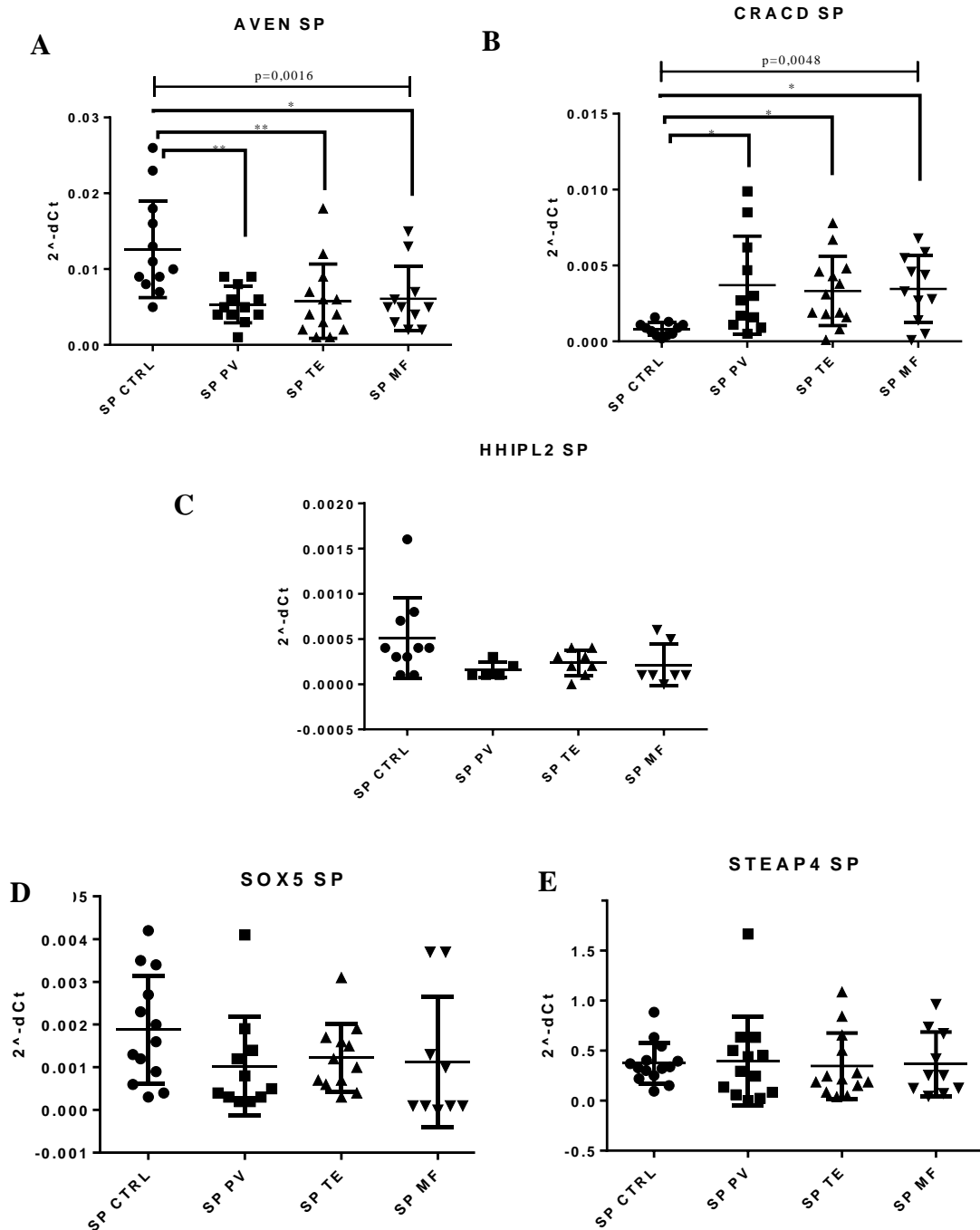
O oposto ocorreu para o gene *CRACD*, cuja expressão foi significativamente diferente entre os quatro grupos ( $p=0,0048$ ), sendo significativamente maior na comparação entre cada NMPs em relação ao grupo de controles saudáveis.

Não houve diferença significativa na expressão do gene *HHIPL2* na comparação dos quatro grupos utilizando o teste de Anova. No entanto, quando comparamos os grupos de dois a dois pelo teste de Mann-Whitney, a expressão deste gene foi significativamente menor na PV em relação aos controles saudáveis ( $p = 0,0390$ ).

De forma semelhante, não houve diferença significativa na expressão do gene *SOX5* na comparação dos quatro grupos, porém sua expressão foi significativamente menor na PV em relação ao grupo de controles saudáveis ( $p=0,0455$ ) na análise de Mann-Whitney.

Não houve diferença significativa na expressão do gene *STEAP4* na comparação entre os quatro grupos.

Os genes *ADAMTS12*, *FRZB*, *HAND2-AS1* e *HAND2* apresentaram níveis de expressão muito baixos ou até mesmo indetectáveis nas amostras de sangue periférico analisadas e portanto, os dados não foram demonstrados neste documento.



<sup>13</sup>**Figura 11** - Expressão gênica em leucócitos do sangue periférico em PV, TE, MFP e controles saudáveis.

**Fonte:** Elaborado pela Autora

<sup>13</sup> A. Expressão de AVEN. B. Expressão de CRACD. C. Expressão de HHIPL2. D. Expressão de SOX5. E. Expressão de STEAP4. Valores p obtidos a partir do teste de Kruskal-Wallis comparando os quatro grupos PV, TE, MFP e controles saudáveis. \* Nível de significância no pós-teste de Dunn. SP: Sangue periférico. SP CTRL: leucócitos do sangue periférico de controles saudáveis. SP PV: leucócitos do sangue periférico de pacientes com PV. SP TE: leucócitos do sangue periférico de pacientes com TE. SP MF: leucócitos do sangue periférico de pacientes com MFP

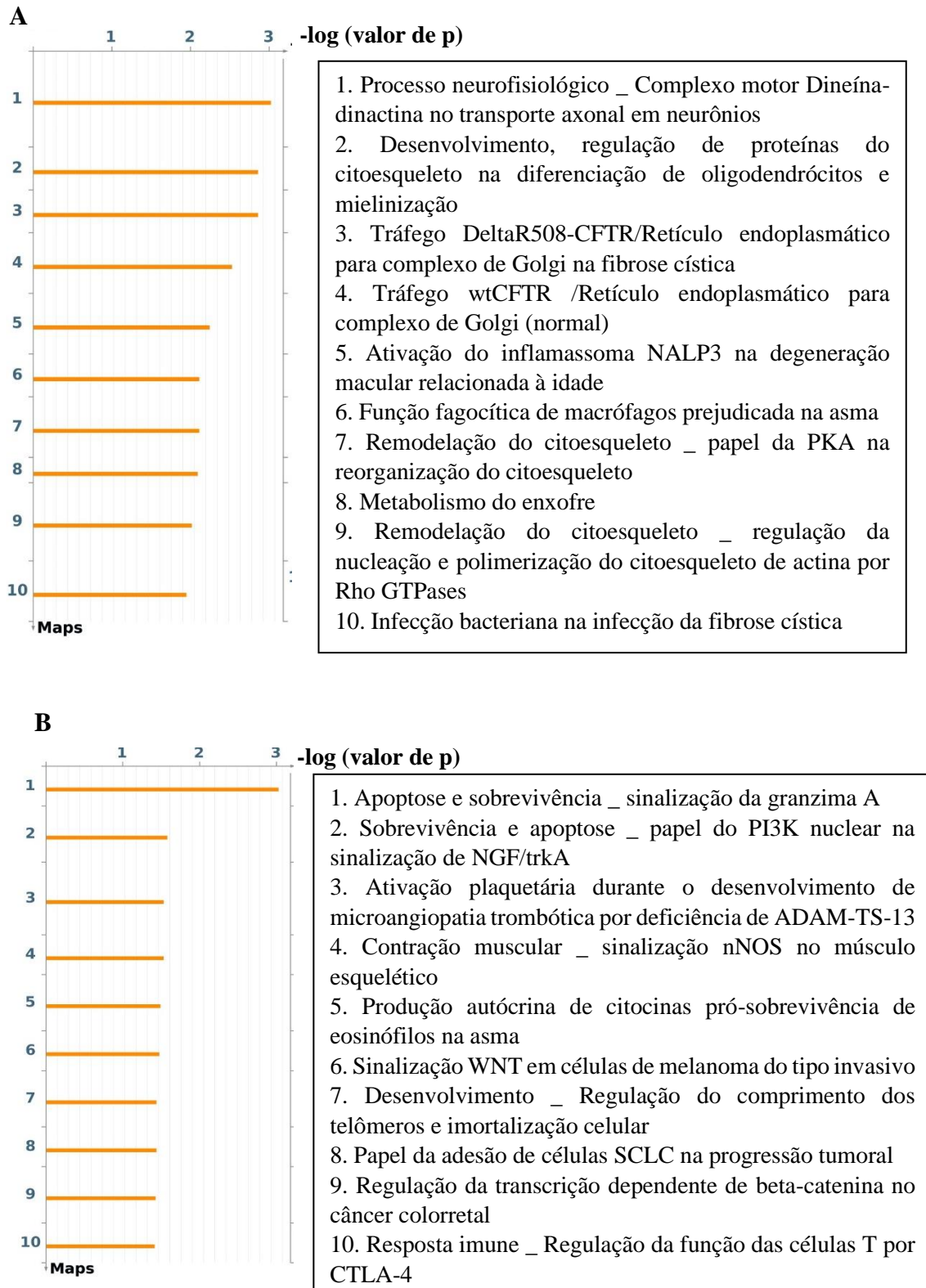
## 5.4 ANÁLISE DE VIAS DE SINALIZAÇÃO UTILIZANDO O METACORE

### 5.4.1 Policitemia Vera: PV-MSc versus CTRL-MSc

As proteínas diferencialmente expressas encontradas nas amostras de PV em relação aos controles, segundo a análise do Perseus, foram submetidas à análise com a ferramenta Metacore. A primeira análise gerada foi de vias de sinalização (Figura 12), que demonstrou entre as vias mais ativadas, algumas relacionadas com remodelagem do citoesqueleto, tráfego do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, ativação do NALP3/inflamasomo, e defeitos na função de macrófagos em asma.

Entre as vias moduladas negativamente, destacam-se a via de Granzima A e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) de apoptose e sobrevivência, via de sinalização WNT em melanomas invasivos, regulação da transcrição dependente de beta-catenina no câncer colorretal e regulação da função de células T pela Proteína 4 Associada a Linfócitos T Citotóxicos (CTLA-4).

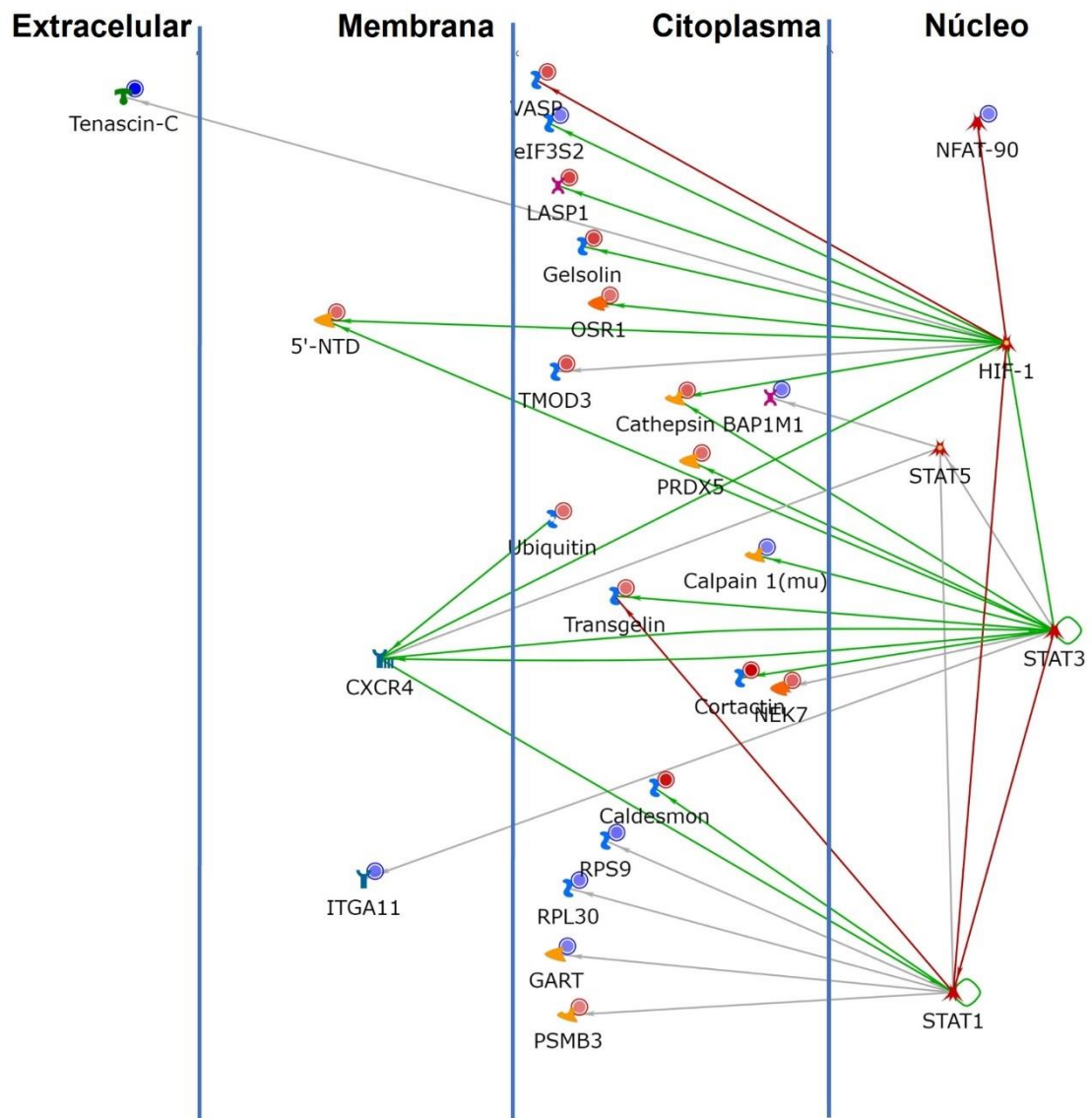
Quando utilizamos a ferramenta do Metacore de modelagem de receptores e ligantes, obtivemos uma lista com 11 redes, das quais chamou a atenção a presença de uma rede com os seguintes elementos: Receptor de quimiocina C-X-C de tipo 4 (CXCR4), HIF1 (Fator 1 induzível por hipóxia, subunidade alfa), STAT1, STAT3, STAT5B, associado ao processo de diferenciação de eritrócitos e resposta a IL-9. Quando se expande essa rede em relação aos ligantes e receptores, surge uma nova rede (Figura 13), que organizamos por localização subcelular, na qual destacam-se no núcleo os fatores HIF1A, Fator Nuclear da célula T Ativada (NFAT) e STAT, diversos alvos citoplasmáticos que encontravam-se diferencialmente expressos de acordo com os dados de proteômica, o CXCR4 como alvo de membrana e a TNC como alvo extracelular. A TNC estava regulada negativamente nos dados de PV-MSc versus CTRL-MSc (Figura 8).



<sup>14</sup>Figura 12 - Vias de sinalização na PV, segundo a análise na ferramenta Metacore

Fonte: Elaborado pela Autora

<sup>14</sup> A. Vias de sinalização relacionadas às proteínas reguladas negativamente. B. Vias de sinalização relacionadas às proteínas reguladas negativamente.



**Figura 13** - Redes de sinalização na PV, segundo a análise na ferramenta Metacore  
**Fonte:** Elaborado pela Autora

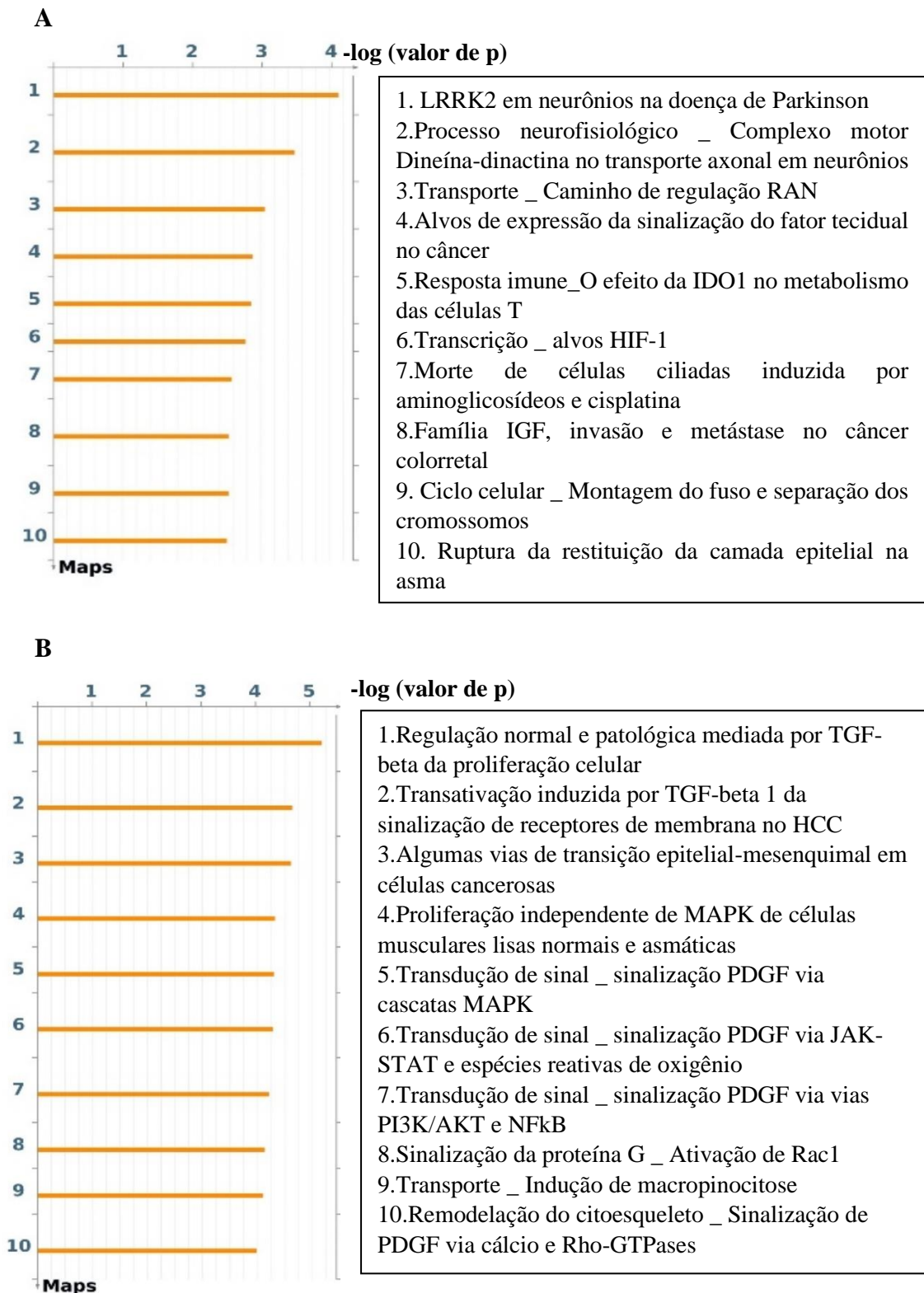
#### 5.4.2 Trombocitemia Essencial: TE-MSC versus CTRL-MSC

Do mesmo modo, as proteínas diferencialmente expressas encontradas nas amostras de TE-MSC em relação aos controles, segundo a análise do Perseus, foram submetidas a análises com a ferramenta Metacore. A primeira análise gerada foi de vias de sinalização (Figura 14), entre as quais destacam-se a ativação de alvos do fator tecidual em câncer, efeitos da indoleamina 2,3-Dioxigenase 1 (IDO1) sobre o metabolismo de células T e a transcrição de alvos de HIF1A. Quando utilizamos a ferramenta do Metacore de modelagem de receptores e ligantes, surgem 5 redes, entre as quais destacamos a rede Receptor Específico de Produtos Finais de Glicosilação Avançada (RAGE)/p53 (Figura 15). Nesta rede, temos a presença de

inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), CD59, Catepsina D e PON2. Este último estava diferencialmente expresso nos dados de proteômica de TE-MSK versus CTRL-MSK.

#### 5.4.3 Comparação de PV-MSK e TE-MSK

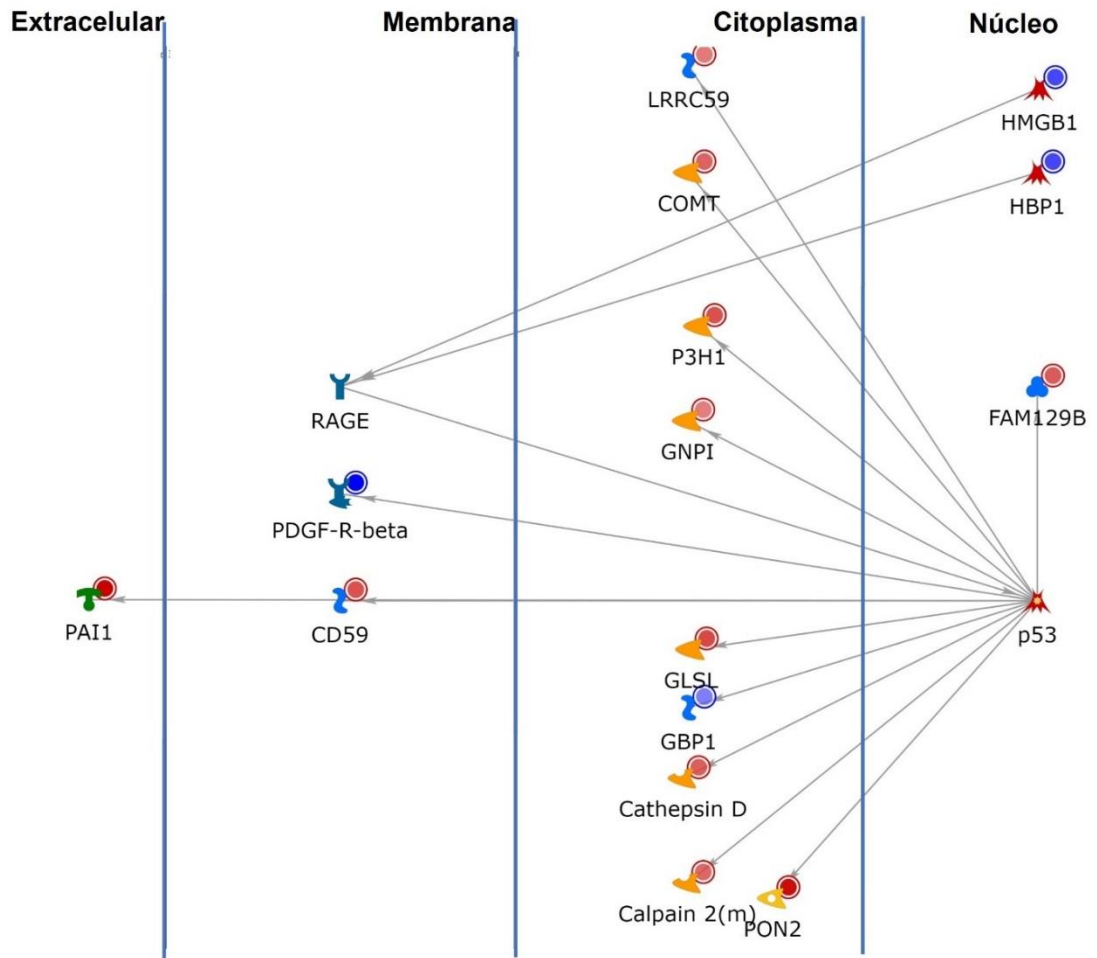
A comparação entre as análises PV-MSK versus CTRL-MSK e TE-MSK versus CTRL-MSK também foi realizada no Metacore, que permite visualizar as redes de processos unicamente modulados em PV e TE (Tabelas 6 e 7 respectivamente). Dentre estas, destaca-se as vias de resposta a citocinas ativadas em TE-MSK versus CTRL-MSK, com participação de moléculas diferencialmente expressas apenas em TE-MSK versus CTRL-MSK, como o inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) e a proteína de grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1). A rede de resposta ao estresse celular, ativada em PV-MSK versus CTRL-MSK tem como destaque as moléculas Proteína-L-Isoaspartato (D-Aspartato) O-Metiltransferase (PCMT1) e Fator de splicing rico em prolina e glutamina (SFPQ).



<sup>15</sup>Figura 14 - Vias de sinalização na TE, segundo a análise na ferramenta Metacore

Fonte: Elaborado pela Autora

<sup>15</sup> A. Vias de sinalização relacionadas às proteínas reguladas negativamente. B. Vias de sinalização relacionadas às proteínas reguladas negativamente



**Figura 15** - Redes de sinalização na TE, segundo a análise na ferramenta Metacore  
**Fonte:** Elaborado pela Autora



**Tabela 6** - Análise de rede de processos unicamente modulados na PV, usando o Metacore

No	Rede	Processos	Tamanho	Alvo	Vias	Valor de p	Score z	Score g
<b>1</b>	TAGLN2, GMPPA, NF45 (ILF2), Calponin-3, TMOD3	processo viral (34,0%), regulação negativa da organização do componente celular (29,8%), localização celular (51,1%), localização (70,2%), processos do sistema muscular (21,3%)	50	14	0	3.54e-37	103.23	103.23
<b>2</b>	Matrin-3, Scrapper, PSMD13, CRP1, Rab-23	processo catabólico de macromoléculas celulares (34,0%), processo catabólico de mRNA transcrito nuclear, deterioração mediada por absurdo (16,0%), processo catabólico de macromoléculas (34,0%), Proteína co-traducional dependente de SRP direcionada à membrana (14,0%), anáfase promovendo processo catabólico dependente complexo (14,0%)	50	14	0	4.91e-37	102.19	102.19
<b>3</b>	SFPQ, RPS7, UBC, RPS3, PCMT1	resposta celular ao estresse (70,8%), resposta ao estresse (77,1%), regulação negativa do processo biológico (87,5%), processo metabólico da proteína celular (70,8%), regulação da expressão gênica (81,2%)	50	13	0	4.07e-34	95.85	95.85

Fonte: Elaborado pela Autora

**Tabela 7** - Análise de rede de processos unicamente modulados na TE, usando o Metacore

No	Rede	Processos	Tamanho	Alvo	Vias	Valor de p	Score z	Score g
<b>1</b>	HMGB1, PAI1, NF-kB, RelA, TRAF6	resposta celular ao estímulo de citocinas (84,8%), resposta celular à interleucina 1 (58,7%), via de sinalização mediada por citocinas (73,9%), resposta à interleucina 1 (58,7%), resposta à citocina (84,8%)	52	2	934	8.64e-05	17.16	1184.66
<b>2</b>	ANP32E, P3H3, USP5, RanBP1, LMCD1	transporte mediado do retículo endoplasmático para a vesícula de Golgi (20,0%), processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico exógeno via MHC classe II (16,0%), processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico via MHC classe II (16,0%), processamento de antígeno e apresentação de antígeno de peptídeo ou polissacarídeo via MHC classe II (16,0%), Transporte da vesícula de Golgi (22,0%)	50	21	0	2.24e-63	185.00	185.00
<b>3</b>	ERp44, MSAP, TIP120A, LENG4, Septin 7	transporte mediado do retículo endoplasmático para a vesícula de Golgi (22,0%), transporte mitocondrial de elétrons, ubiquinol para citocromo c (10,0%), transporte mediado por vesícula (46,0%), processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico exógeno via MHC classe II (16,0%), processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico via MHC classe II (16,0%)	50	17	0	1.88e-49	149.74	149.74

**Fonte:** Elaborado pela Autora

## 6 DISCUSSÃO

O perfil de expressão dos genes codificando as proteínas selecionadas segundo a análise de proteômica (CTTN, MAP4, TNC, RANBP1 e PON2), e dos genes selecionados na análise in silico (*ADAMTS12*, *AVEN*, *CRAD*, *HHIPL2*, *STEAP4* e *SOX5*), foi comparado a dados da literatura e de bancos públicos, relacionados a esses genes, para tentar entender o papel que possam desempenhar na PV, TE ou na MFP.

A cortactina (CTTN) estava mais expressa em PV, segundo dados da análise proteômica, embora não tenha sido possível validar essa diferença por análise da expressão do gene CTTN. A CTTN contribui para a organização do citoesqueleto de actina (VON HOLLEBEN et al., 2011), desempenha um papel na formação de lamelipódios e na migração celular.

A CTTN é um substrato específico da tirosina-fosfatase Shp-1, e usa fosforilação/desfosforilação afeta a formação de invadopodia e, como consequência disso, a capacidade das células de melanoma de invadir a matriz extracelular. Shp-1 pode ser considerada um regulador da invasividade do melanoma e um alvo em potencial para drogas anti-metastáticas (VARONE et al., 2021). Há um relato na literatura de expressão diminuída de Shp-1 em progenitores eritróides de PV, tanto o gene quanto a proteína (WICKREMA et al., 1999). Este relato não aborda a CTTN, mas pode haver uma relação ainda não investigada entre essas proteínas na PV. Outro relato, este em granulócitos de PV, demonstrou que a expressão do gene SHP-1 não estava alterada (ASIMAKOPOULOS et al., 1997).

Um dado importante sobre a CTTN em relação às NMPs é que a CALR regula a transcrição de CTTN através de STAT3. A transcrição de CTTN é regulada por meio da ligação de STAT3 à região promotora de CTTN. A CTTN promove a invasividade de vários tipos de células tumorais por meio da sua atividade sobre a montagem de actina cortical e dinâmica de membrana. A regulação negativa de CALR diminui a quantidade de CTTN no meio intracelular (DU et al., 2009). CALR é um dos genes que pode estar mutado nas NMPs e, portanto, hipotetiza-se aqui alguma relação que pode ser investigada nos casos de NMPs em que ocorre essa mutação.

A CTTN está regulada positivamente em leucemia linfocítica crônica (LLC) e sua expressão correlaciona-se com a liberação de MMP9 e com a mobilidade das células neoplásicas (MARTINI et al., 2017). A expressão e a fosforilação de CTTN são reduzidas após tratamento com Ibrutinib (inibidor de Btk).

Outros relatos sobre a CTTN dizem respeito à regulação que esta proteína exerce sobre a axis CXCL12/CXCR4. A CTTN liga-se à actina e assim regula a resposta ao CXCL12 em células que superexpressam CXCR4. Destaca-se também que a expressão de CXCR4 na membrana é dependente da expressão de CTTN, que por sua vez depende da calcineurina (PASSARO et al., 2015). Alta expressão de CTTN aumentam a transmigração em resposta ao CXCL12 (VELÁZQUEZ-AVILA et al., 2019). A axis CXCL12/CXCR4 é um fator central na regulação da homeostase do sistema hematopoético. Em relação às NMPs, os relatos de alteração dessa axis são variados. Ramos e colaboradores afirmam que não há variação na expressão de CXCL12 nas MSC de PV, ET e PMF (RAMOS et al., 2017). Há relato de que a presença de CTHs leva à diminuição da expressão de CXCL12, que diminui ainda mais na presença de CTHs com a mutação JAK2 V617F; assim como a regulação negativa de CXCL12 nos osteoblastos de NMPs que aumenta a mobilização das células precursoras hematopoéticas, que assim diminuem em número na MO. (GREENBAUM et al., 2013).

MAP4 (Proteína associada a microtúbulo 4), é uma proteína que em condições normais interage e assim estabiliza os microtúbulos. Uma vez fosforilada, MAP4 dissocia-se dos microtúbulos, levando à desmontagem dos mesmos e à instabilidade dinâmica, afetando as propriedades dos microtúbulos (EBNETH et al., 1999). MAP4 desempenha um papel também na progressão do ciclo celular (CHANG et al., 2001).

MAP4 estava positivamente regulada em MSCs da PV em relação aos controles, em nossa análise de proteômica. Na literatura, não encontramos dados sobre MAP4 nas NMPs. No entanto, a proteína MAP4 mostrou-se negativamente regulada em linhagem estromal HS5 co-cultivada com células hematopoéticas KG1, em relação as células HS5 sozinhas (LIU et al., 2019).

A proteína TNC (Tenascina-c) estava negativamente regulada na PV de acordo com a análise de proteômica e houve uma tendência à menor expressão do gene TNC nas MSC das NMPs, embora não tenha sido significativa. TNC é uma proteína de matriz extracelular expressa em nichos de células-tronco, sendo um componente crítico do MMO para a regeneração hematopoiética (NAKAMURA-ISHIZU et al., 2012; DESTERKE et al., 2015c, 2015a). Também foi relatado que a TNC pode influenciar positiva ou negativamente os números de CTHs na medula óssea e está entre uma série de fatores que apresentam maior caracterização em termos de fonte celular ou papel em relação ao nicho (MORRISON; SCADDEN, 2014). A TNC é expressa especificamente na região periosteal e nas paredes das artérias na medula óssea saudável. Sua expressão aumenta quando há alterações na medula

óssea, como por exemplo, na leucemia mielóide e na mielofibrose (SOINI et al., 1993; REILLY, 1997; CHIQUET-EHRISMANN et al., 2014).

As células estromais aderentes foram identificadas como a fonte de TNC em populações de células da medula óssea (EKBLÖM et al., 1993; KLEIN; BECK; MÜLLER, 1993). A TNC expressa no estroma atua para ancorar as CTHs (KLEIN; BECK; MÜLLER, 1993) e a interação de CTHs com a TNC aumenta notavelmente a proliferação (SEIFFERT et al., 1998).

A hiperresponsividade das MSCs de MO, resultante da inflamação, pode levar à liberação/ativação de efetores que contribuem para a fibrose, entre os quais a TNC (DESTERKE et al., 2015a).

A TNC, observada na mielofibrose com hiperplasia megacariocítica, tem forte impacto na inflamação crônica e na ativação e sinalização do TGF- $\beta$  (KASPRZYCKA; HAMMARSTRÖM; HARALDSEN, 2015).

Durante a hematopoese, a via de sinalização do TGF- $\beta$  é um potente regulador negativo da proliferação enquanto estimula a diferenciação e a apoptose quando apropriado. Em neoplasias hematológicas, incluindo leucemias, distúrbios mieloproliferativos, linfomas e mieloma múltiplo, desenvolve-se uma resistência aos efeitos homeostáticos do TGF- $\beta$ . Os mecanismos para esta resistência incluem mutação ou deleção de membros da via de sinalização de TGF- $\beta$  e interrupção da via por oncoproteínas. Essas alterações definem um papel supressor de tumor da via do TGF- $\beta$  em neoplasias hematológicas. Por outro lado, níveis elevados de TGF- $\beta$  podem promover a mielofibrose e algumas malignidades hematológicas por meio de seus efeitos no estroma e no sistema imunológico (DONG; BLOBE, 2006). O papel patogênico do TGF- $\beta$  na fibrose da medula óssea nas neoplasias mieloproliferativas já foi descrito (MARTYRÉ, 1995; KREIPE et al., 2012; AGARWAL et al., 2016). A sinalização de TGF- $\beta$  contribui para mielofibrose e dominância clonal de neoplasias mieloproliferativas (YAO et al., 2019). Se a expressão de TNC estiver diminuída, podemos concluir que há uma interferência negativa sobre a atividade TGF- $\beta$ .

PON2 (paraoxonase 2) codifica uma proteína expressa de forma ubíqua nos tecidos humanos, nos quais pode atuar como um antioxidante celular e anti-inflamatório (MANCO; PORZIO; CARUSONE, 2021). No entanto, PON2 é capaz de promover a formação tumoral ((WITTE et al., 2012; MANCO; PORZIO; CARUSONE, 2021). A deficiência de PON2 já foi associada com perturbações na eritropoiese (SPIECKER et al., 2021)

Nas NMPs, o nível de estresse oxidativo é elevado, e poderia estar relacionado aos eventos vasculares (DURMUS et al., 2013, 2014; MARTY et al., 2013; BJØRN;

HASSELBALCH, 2015; ALLEGRA et al., 2020). PON2 foi mostrado como capaz de diminuir o estresse oxidativo vascular (HORKE et al., 2007)

A regulação positiva de PON2 na TE encontrada na análise de proteômica no nosso trabalho é, portanto, compatível. É importante ressaltar o fato de que a proteína PON2 está exclusivamente mais expressa na TE, e não na PV em nossas análises de proteoma, o que pode indicar um papel exclusivo ou diferente de PON2 nesta NMP e é condizente com as funções conhecidas desta proteína. Apesar de haver uma tendência ao aumento da expressão do gene PON2 nas MSC das NMPs, essa diferença não foi significativa.

A proteína RANBP1 (*RAN binding protein*) estava regulada negativamente na TE em nossa análise de proteômica. RANBP1 forma um complexo com a proteína nuclear relacionada à Ras (Ran) e metaboliza o trifosfato de guanosídeo (GTP). Este complexo participa da regulação do ciclo celular controlando o transporte de proteínas e ácidos nucleicos para o núcleo. Não encontramos relação entre RANBP1 e NMPs na nossa busca na literatura. A expressão do gene RANBP1 não apresentou diferença significativa entre as NMPs ou em relação ao controle saudável, tanto em MSC quanto em leucócitos.

A proteína ADAMTS12, do inglês *A Disintegrin-Like And Metalloprotease (Reprolysin Type) With Thrombospondin Type 1 Motif, 12*, é uma metaloproteinase que tem papel descrito na inflamação e no câncer, entre outros.

Não foi possível demonstrar expressão do gene *ADAMTS12* nos leucócitos de sangue periférico no presente trabalho. Nas MSCs da medula óssea, a expressão de *ADAMTS12* não mostrou diferença entre a PV, TE, MSC e controles saudáveis. O dado depositado GSE44426 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44426>) identificou *ADAMTS12* como um gene positivamente regulado nas MSCs de medula óssea de MFP, quando comparadas a MSCs de controles saudáveis. O gene *ADAMTS12* codifica uma proteína importante para a inflamação, sendo sua deficiência relacionada ao aumento nos marcadores inflamatórios; enquanto sua presença relacionou-se com a indução de apoptose em neutrófilos (MONCADA-PAZOS et al., 2012). ADAMTS-12 foi descrito como uma molécula que pode atuar como supressor tumoral ou como um agente pró-tumoral. Sua atividade de proteinase pode ser modificada pela interação com outras proteínas e, portanto, esta pode ser uma forma alternativa de modular as funções da ADAMTS12 (MOHAMEDI et al., 2021).

A proteína AVEN (do inglês *Apoptosis And Caspase Activation Inhibitor*) é um regulador da morte celular, que atua como inibidor da apoptose e da ativação da caspase (CHAU et al., 2000) AVEN já foi relatada como um inibidor da apoptose em outras neoplasias hematológicas (PAYDAS et al., 2003; CHOI et al., 2006; EISSMANN et al., 2013) e a fusão

do gene AVEN com o gene NUTM1 foi descrita em leucemias mieloides agudas (YUAN et al., 2021).

Nossos resultados demonstraram uma menor expressão de AVEN em leucócitos do sangue periférico de pacientes com TE em relação aos controles saudáveis, em concordância com os dados encontrados nos dados públicos GSE26049 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE26049>), na comparação do sangue periférico de TE com os controles saudáveis. No entanto, nosso resultado em PV e MFP demonstraram menor expressão de AVEN em comparação aos controles saudáveis, enquanto este gene estava mais expresso na PV e na MFP segundo dados descritos no GSE26049 (SKOV et al., 2011). Embora seja um dos genes diferencialmente expressos na TE em relação aos controles no GSE26049, o gene AVEN não foi abordado nos resultados dos artigos gerados a partir desses dados.

No que diz respeito à expressão de AVEN nas MSCs, não houve diferença de expressão entre as três NMPs na comparação entre si e com as MSCs de controles. Nosso dado difere do dado público GSE44426, no qual foi descrita maior expressão deste gene nas MSCs de MFP em relação a MSC de controles saudáveis (DESTERKE et al., 2015b).

Apesar disso, a maior expressão de AVEN em leucócitos do sangue periférico de TE encontrada no presente trabalho pode indicar uma função diferente e ainda desconhecida deste gene nesta NMP.

A proteína CRACD, do inglês *Capping protein inhibiting regulator of actin dynamics*, é envolvida na integridade das células epiteliais, atuando na manutenção do citoesqueleto de actina. CRACD regula positivamente a polimerização da actina, inibindo a interação das proteínas capeadoras de actina com a actina (JUNG et al., 2018).

Nossos dados demonstraram maior expressão de CRACD em leucócitos do sangue periférico de todas as três NMPs em relação aos controles saudáveis. Isso está de acordo com o GSE26049 de Skov e colaboradores (SKOV et al., 2011), que demonstra uma maior expressão de CRACD na MFP. No entanto, essa regulação não foi exclusiva de MFP, pois também houve maior expressão de CRACD o em TE e PV. A expressão de CRACD, que foi significativamente maior no sangue periférico dos pacientes com todas as NMPs, pode estar relacionada a uma maior atividade proliferativa das células do componente hematopoético, de forma semelhante ao relatado na MFP (DE MELO CAMPOS, 2016). Embora não seja um marcador de uma NMP específica, CRACD parece ser uma molécula importante para essas neoplasias, merecendo atenção para estudos complementares.

No caso da MFP, a menor expressão de CRACD nas MSCs de MFP segundo os dados do GSE44426 poderia estar relacionada com a fibrose medular, com ativação de beta-catenina. Nos nossos dados, encontramos uma tendência de menor expressão de CRACD nas amostras de MSC dos pacientes com NMPs em relação aos controles, principalmente, nos casos de MFP, mas a diferença não foi significativa. Essa tendência é concordante com os dados descritos no GSE44426, nos quais também houve menor expressão de CRACD nas MSC de MFP em relação aos controles (DESTERKE et al., 2015b).

CRACD encontra-se regulado negativamente no câncer colorretal (CCR). A perda de CRACD no CCR inibe a polimerização da F-actina e conseqüentemente ocorre perturbação do complexo caderina-catenina-actina, levando à liberação de  $\beta$ -catenina e hiperatividade da via de sinalização WNT (JUNG et al., 2018). A repressão de CRACD suprime a proliferação e induz apoptose em linhagens de câncer de pulmão (CUI et al., 2020).

O gene *FRZB* (*Frizzled Related Protein*) codifica uma proteína envolvida na regulação do desenvolvimento ósseo e da maturação dos condrócitos (THYSEN; CAILOTTO; LORIES, 2016). *FRZB* é um antagonista da via de sinalização WNT-  $\beta$ -catenina (SHAHNAZARI et al., 2008). A análise do GSE44426 apontava uma expressão significativamente menor de *FRZB* em comparação ao controle. No nosso trabalho, embora haja uma tendência à menor expressão de *FRZB* nas MSC das NMPs, houve muita variabilidade e não houve diferenças significativas. A expressão significativamente aumentada da  $\beta$ -catenina na medula óssea com mielofibrose (LUCIJANIC et al., 2016) foi demonstrada, em concordância com GSE44426, que mostrou a menor expressão do *FRZB*, que é regulador negativo desta via,. Resultado semelhante foi demonstrado em PMF e TE, por imunohistoquímica de biópsia da medula óssea, nas quais ocorreu expressão aumentada de  $\beta$ -catenina (GEDUK et al., 2015). Dessa maneira, há indícios de maior atividade da via de beta-catenina nas NMPs no componente hematopoético, mas a menor expressão de *FRZB* no componente estromal indica que o estroma não responde à estimulação enviada pelas células hematopoéticas.

O gene *HHIPL2* (Hedgehog Interacting Protein-Like 2) mostrou na análise em *sílico* do GSE44426 uma expressão diminuída em relação ao controle. *HHIPL2* codifica uma proteína cujo papel ainda é pouco conhecido. No entanto, outro membro da família, *HHIP*, é um regulador da via de sinalização Hedgehog, interagindo com as proteínas homônimas (CHUANG; MCMAHON, 1999). A via de sinalização Hedgehog demonstrou desempenhar um papel na hematopoese normal e na tumorigênese de neoplasias hematológicas. Além disso, os inibidores da via Hedgehog demonstraram ser capazes de inibir o crescimento e a capacidade de autorrenovação em modelos pré-clínicos de mielofibrose, de diminuir a fibrose da medula



óssea e a contagem dos leucócitos e das plaquetas, tendo portanto um potencial papel antiproliferativo (TIBES; MESA, 2014; VADEIKIENĖ et al., 2021).

STEAP4, do inglês *Six Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 4*, codifica uma metaloprotease, que se mostrou significativamente menor em MSCs de MFP na análise do dado do GSE44426, em comparação aos controles saudáveis. Nossa análise não mostrou diferença significativa na expressão deste gene, tanto nas MSCs quanto em leucócitos do sangue periférico. Os membros da família STEAP já foram descritos como tendo uma função de supressor tumoral (no câncer da mama) (WU et al., 2020). No entanto, o câncer colorretal foi associado a uma expressão aumentada de STEAP4 (XUE et al., 2017). Em nossa busca bibliográfica, não encontramos descrição da expressão diferencial de STEAP4 em neoplasias hematológicas.

SOX5 (*SRY-box Transcription fator 5*) é um gene que codifica um fator de transcrição envolvido na regulação do desenvolvimento embrionário e na determinação do destino celular. Mais especificamente, a proteína codificada desempenha um papel na condrogênese, na qual SOX5 coopera com SOX6 na regulação da diferenciação dos condrócitos, ativando o gene do colágeno de tipo II (LEFEBVRE, 1998; LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001; SMITS et al., 2004). No dado do GSE44426, o SOX5 estava menos expresso nas MSCs em relação ao controle. Nossos resultados foram semelhantes, embora não significativos, com expressão menor de SOX5 nas três NMPs, quando comparadas ao controle. O SOX5 poderia ter um papel a esclarecer na regulação do colágeno, visto que a PV e a TE podem apresentar fibrose e evoluir para um mielofibrose secundária.

De acordo com o esperado, as amostras de MSC de MFP foram mais difíceis de coletar e de expandir, resultando em um número baixo de células mesenquimais, impossibilitando a obtenção de quantidade suficiente de extratos proteicos para a espectrometria de massas. Assim, obtivemos as proteínas diferencialmente expressas comparando-se MSCs de pacientes com PV e TE contra MSCs de controles saudáveis.

Dentre as vias de sinalização moduladas positivamente em PV-MSc vs CTRL-MSc, de acordo com a ferramenta Metacore, destacamos a presença da via de ativação de NALP3 inflamassomo e regulação do citoesqueleto. Na via NALP3, as proteínas reguladas positivamente foram Catepsina D e Ubiquitina C. Os níveis elevados de IL-1B e IL-18 características da ativação da via de inflamassomo, já foi descrito em pacientes com PV e TE em relação aos controles saudáveis, sendo mais intensa a elevação em PV do que em TE

(COMINAL et al., 2021)). Outro estudo, no entanto, não verificou essa maior expressão de IL-1B na PV comparada com a TE (POURCELOT et al., 2014).

Entre os ligantes e receptores diferencialmente regulados em PV-MSC versus CTRL-MSC, segundo o Metacore, encontramos alvos regulados positivamente pelo fator de transcrição HIF1A (Figura 13) e que de fato aparecem com regulação positiva nos dados de PV-MSC versus CTRL-MSC, como LASP1, Gelsolin, OXSR1 e Cathepsin B, corroborando uma possível regulação positiva de HIF1A e seus alvos na PV. Apesar desses dados concordantes, outros alvos não apresentaram a regulação que seria esperada se houvesse ativação de HIF1A, como é o caso de TNC (tenascin). A TNC foi descrita como tendo correlação positiva com HIF1A em glioblastomas, nos quais a expressão de TNC também pôde ser correlacionada positivamente com a agressividade tumoral (BENITA et al., 2009). Nos nossos dados de espectrometria de massas, TNC estava menos expresso em PV-MSC quando comparado a CTRL-MSC, então seria discordante deste dado da literatura. Outro relato também afirma a correlação positiva entre TNC e ativação de genes induzidos por hipóxia (MIROSHNIKOVA et al., 2016). Já foi relatada maior transcrição de alvos de HIF1A em granulócitos de PV, nos quais também ocorreu maior transporte de glicose (GANGARAJU et al., 2020). A via do HIF1A já foi apontada como um possível alvo em PV (BAUMEISTER et al., 2020).

Quanto às vias de sinalização reguladas negativamente em PV-MSC vs CTRL-MSC, encontramos a via de apoptose e sobrevivência da Granzima A. Nesta via, as proteínas reguladas negativamente em PV foram HNRNPU e HNRNPC. Não encontramos relatos anteriores de desregulação da via da Granzima A em neoplasias mieloproliferativas. Duas vias relacionadas com sinalização WNT e beta-catenina também estavam reguladas negativamente e relacionadas com a expressão diminuída em PV das proteínas Tenascin C (TNC) e calpaína 1 (CAPN1). Encontramos apenas um estudo que identificou maior ativação de beta-catenina em PV, embora tenha sido realizado com baixo número de amostras de PV e tenha descrito maior atividade da via em MFP (GEDUK et al., 2015).

As MSCs são células com função secretora bastante ativa, tanto que suas propriedades estão bastante relacionadas às proteínas secretadas, que são a maioria das proteínas biologicamente ativas produzidas por estas células. Quando se cultivam células mesenquimais, as proteínas secretadas ficam no sobrenadante do cultivo, então quando fazemos proteômica do extrato celular, não temos acesso ao conteúdo secretado. A atividade primariamente secretora das MSCs, faz com que a maquinaria celular delas fique voltada para a secreção e, portanto, os resultados que nós obtivemos não refletem com objetividade a função das MSCs. No entanto,

estas células não são facilmente separadas de outros tipos celulares provenientes da medula óssea sem etapas de cultivo e, portanto, obtê-las sem o cultivo prévio é quase impossível. Uma forma eficiente de ter acesso às proteínas secretadas seria acessar o proteoma do sobrenadante de cultivo. Neste trabalho, essa estratégia foi cogitada, porém não obtivemos quantidade suficiente de proteínas e o pouco que obtivemos nestas tentativas, estava muito contaminado com soro bovino fetal, usado para o cultivo celular. Outro fator que explica os resultados contraditórios foi o uso de expressão gênica para validação de dados obtidos por análise de proteômica, Não dispúnhamos de amostras de extrato proteico para essas validações e o uso de expressão gênica para tal validação gera resultados inconsistentes, que podem ser explicados por regulação pós-transcricional, nas quais genes transcritos podem não ser traduzidos em proteínas; ou até mesmo por modificações pós-traducionais, que podem levar à degradação de proteínas já transcritas. Outro fator envolvido seria a própria secreção da maioria das proteínas produzidas pelas MSC, que estariam inacessíveis na análise do extrato celular que foi realizado.

A principal limitação deste estudo é o número baixo de amostras que foi possível incluir, principalmente para o estudo de proteômica feito com as células mesenquimais. Outra limitação foi a ausência da genotipagem de MPL. Além disso, uma limitação que não é somente deste estudo mas de todos que usam células mesenquimais é o seu baixo número na medula óssea, sua heterogeneidade e a falta de um marcador para isolar diretamente estas células da medula óssea. Esses fatores tornam necessário o cultivo dessas células pelo menos até a terceira passagem, o que certamente modifica o seu fenótipo em comparação com aquele que possuíam no microambiente na medula óssea.

## 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos indicam a expressão diferencial de algumas moléculas que podem ser potenciais marcadores das NMPs. Uma molécula é AVEN, significativamente mais expresso nos leucócitos de sangue periférico das três NMPs em relação aos controles, e a outra molécula foi CRACD, significativamente menos expresso nos leucócitos de sangue periférico dos três tipos de NMPs em relação aos controles. Apesar disso, não foi possível identificar moléculas que possam diferenciar as três NMPs umas das outras por meio da expressão de genes ou proteínas nas MSCs de medula óssea dos pacientes com essas neoplasias.

Pretendemos verificar no futuro a expressão das proteínas candidatas identificadas pela análise de espectrometria de massas (CTTN, MAP4, TNC, RANBP1, PON2) por meio de western-blot de extratos proteicos obtidos de maior número de amostras de pacientes com NMPs.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF- $\beta$ . **Stem cell investigation**, v. 3, p. 5, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27358897>>.
- AGARWAL, P.; BHATIA, R. Influence of Bone Marrow Microenvironment on Leukemic Stem Cells. In: [s.l: s.n.]p. 227–252.
- ALLEGRA, A. et al. Synergic Crosstalk between Inflammation, Oxidative Stress, and Genomic Alterations in BCR–ABL–Negative Myeloproliferative Neoplasm. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1037, 23 out. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1037>>.
- 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 maio 2016. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/127/20/2391/35255/The-2016-revision-to-the-World-Health-Organization>>.
- ASADA, N. et al. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. **Nature Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 214–223, 20 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncb3475>>.
- ASADA, N.; TAKEISHI, S.; FRENETTE, P. S. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. **International Journal of Hematology**, v. 106, n. 1, p. 45–54, 22 jul. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12185-017-2262-9>>.
- ASIMAKOPOULOS, F. A. et al. The gene encoding hematopoietic cell phosphatase (SHP-1) is structurally and transcriptionally intact in polycythemia vera. **Oncogene**, v. 14, n. 10, p. 1215–22, 13 mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9121771>>.
- BARBUI, T. et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. **Blood cancer journal**, v. 8, n. 2, p. 15, 9 fev. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0054-y>>.
- BAROSI, G. et al. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: Result of a European LeukemiaNet consensus conference. **Blood**, v. 113, n. 20, p. 4829–4833, 2009.
- BAUERMEISTER, D. E. Quantitation of Bone Marrow Reticulin—A Normal Range. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 24–31, 1 jul. 1971. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1093/ajcp/56.1.24>>.
- BAUMEISTER, J. et al. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is a new therapeutic target in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 34, n. 4, p. 1062–1074, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31728053>>.
- 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. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/112/1/141/24045/MPL-mutations-in->

myeloproliferative-disorders>.

BEER, P. A.; GREEN, A. R. Pathogenesis and management of essential thrombocythemia. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 621–628, 2009.

BELLANNÉ-CHANTELOT, C. et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 346–352, 2006.

BENITA, Y. et al. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 14, p. 4587–602, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19491311>>.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell stem cell**, v. 2, n. 4, p. 313–9, 10 abr. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590908001148>>.

BJØRN, M. E.; HASSELBALCH, H. C. The Role of Reactive Oxygen Species in Myelofibrosis and Related Neoplasms. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/648090/>>.

BOYD, E. M. et al. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. **British Journal of Haematology**, v. 149, n. 2, p. 250–257, abr. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2010.08083.x>>.

BRYDER, D.; ROSSI, D. J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic Stem Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 2, p. 338–346, ago. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.060312>>.

CALVI, L. M. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 841–846, out. 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature02040>>.

CAMPBELL, P. J.; GREEN, A. R. The Myeloproliferative Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 23, p. 2452–2466, 7 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra063728>>.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641–650, set. 1991. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.1100090504>>.

CERVANTES, F. et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 2895–2901, 26 mar. 2009. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/113/13/2895/24749/New-prognostic-scoring-system-for-primary>>.

CHAU, B. N. et al. Aven, a Novel Inhibitor of Caspase Activation, Binds Bcl-xL and Apaf-1. **Molecular Cell**, v. 6, n. 1, p. 31–40, jul. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276505000213>>.

CHEUNG, B. et al. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. **British Journal of Haematology**, v. 132, n. 2, p. 244–245, jan. 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2005.05858.x>>.

CHI, J. et al. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1152–1154, 24 maio 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/leu2013382>>.

CHIQUET-EHRISMANN, R. et al. Tenascins in stem cell niches. **Matrix Biology**, v. 37, p. 112–123, jul. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X14000080>>.

CHOI, J. et al. Aven overexpression: Association with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, v. 30, n. 8, p. 1019–1025, ago. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212605004261>>.

CHUANG, P.-T.; MCMAHON, A. P. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. **Nature**, v. 397, n. 6720, p. 617–621, fev. 1999. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/17611>>.

COMINAL, J. G. et al. Bone Marrow Soluble Mediator Signatures of Patients With Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 665037, 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34084749>>.

CONSTANTINESCU, S. N. et al. Functional Consequences of Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. **HemaSphere**, 2021.

CUI, A. et al. Knockdown of CRAD suppresses the growth and promotes the apoptosis of human lung cancer cells via Claudin 4. **Bioscience reports**, v. 40, n. 10, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33006362>>.

CURTO-GARCIA, N.; HARRISON, C.; MCLORNAN, D. P. Bone marrow niche dysregulation in myeloproliferative neoplasms. **Haematologica**, v. 105, n. 5, p. 1189–1200, maio 2020. Disponível em: <<http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2019.243121>>.

DE MELO CAMPOS, P. Primary myelofibrosis: current therapeutic options. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 3, p. 257–263, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521865>>.

DELHOMMEAU, F. et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 22, p. 2289–2301, 28 maio 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0810069>>.

DENU, R. A. et al. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically

Indistinguishable. **Acta Haematologica**, v. 136, n. 2, p. 85–97, 2016. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/445096>>.

DESTERKE, C. et al. Inflammation as a Keystone of Bone Marrow Stroma Alterations in Primary Myelofibrosis. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 415024, 2015a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26640324>>.

DESTERKE, C. et al. Tetraspanin CD9 participates in dysmegakaryopoiesis and stromal interactions in primary myelofibrosis. **Haematologica**, v. 100, n. 6, p. 757–67, jun. 2015b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25840601>>.

DESTERKE, C. et al. Tetraspanin CD9 participates in dysmegakaryopoiesis and stromal interactions in primary myelofibrosis. **Haematologica**, v. 100, n. 6, p. 757–767, 1 jun. 2015c. Disponível em: <<http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2014.118497>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>>.

DONG, M.; BLOBE, G. C. Role of transforming growth factor- $\beta$  in hematologic malignancies. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4589–4596, 15 jun. 2006. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/107/12/4589/129280/Role-of-transforming-growth-factor-beta-in-hematologic>>.

DU, X.-L. et al. Calreticulin promotes cell motility and enhances resistance to anoikis through STAT3-CTTN-Akt pathway in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncogene**, v. 28, n. 42, p. 3714–22, 22 out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684620>>.

DURMUS, A. et al. Increased oxidative stress in patients with essential thrombocythemia. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 17, n. 21, p. 2860–6, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24254553>>.

DURMUS, A. et al. The Thrombotic Events in Polycythemia Vera Patients May Be Related to Increased Oxidative Stress. **Medical Principles and Practice**, v. 23, n. 3, p. 253–258, 2014. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/360102>>.

EISSMANN, M. et al. Overexpression of the anti-apoptotic protein AVEN contributes to increased malignancy in hematopoietic neoplasms. **Oncogene**, v. 32, n. 20, p. 2586–91, 16 maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22751129>>.

EKBLOM, M. et al. Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 4, p. 1037–1045, 15 nov. 1993. Disponível em: <<https://rupress.org/jcb/article/123/4/1037/28747/Downregulation-of-tenascin-expression-by>>.

ELALA, Y. C. et al. Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 5, p. 503–506, 2016. ESSERS, M. A. G. et al. IFN $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 904–908, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature07815>>.



FABRIS, F.; RANDI, M. L. Essential thrombocythemia: Past and present. **Internal and Emergency Medicine**, v. 4, n. 5, p. 381–388, 2009.

FEDERICI, G. et al. Phosphoproteomic Landscaping Identifies Non-canonical cKIT Signaling in Polycythemia Vera Erythroid Progenitors. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 22 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.01245/full>>.

FEL, A. et al. Comparison of Proteome Composition of Serum Enriched in Extracellular Vesicles Isolated from Polycythemia Vera Patients and Healthy Controls. **Proteomes**, v. 7, n. 2, p. 20, 6 maio 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-7382/7/2/20>>.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331–340, abr. 1974. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00007890-197404000-00001>>.

FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor Cells of Mechanocytes. In: [s.l.: s.n.]p. 327–359.

FRIEDENSTEIN, A. J. Marrow Stromal Fibroblasts. **Calcified Tissue International**, v. 56, n. S1, p. S17–S17, 14 jan. 1995. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF03354643>>.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393–403, out. 1970. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>>.

FRIEDENSTEIN, A. J.; LALYKINA, K. S. Thymus cells are inducible to osteogenesis. **European Journal of Immunology**, v. 2, n. 6, p. 602–603, dez. 1972. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830020624>>.

GALÁN-DÍEZ, M.; KOUSTENI, S. A bone marrow niche-derived molecular switch between osteogenesis and hematopoiesis. **Genes & Development**, v. 32, n. 5–6, p. 324–326, 1 mar. 2018. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.314013.118>>.

GANGARAJU, R. et al. Thrombotic, inflammatory, and HIF-regulated genes and thrombosis risk in polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Blood advances**, v. 4, n. 6, p. 1115–1130, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32203583>>.

GANGAT, N. et al. DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 4, p. 392–397, 1 fev. 2011. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.32.2446>>.

GANGAT, N. Myelofibrosis biology and contemporary management. 2020.

GEDUK, A. et al. The Role of  $\beta$ -Catenin in Bcr/Abl Negative Myeloproliferative Neoplasms: An Immunohistochemical Study. **Clinical lymphoma, myeloma & leukemia**, v. 15, n. 12, p. 785–9, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26422250>>.

GOMES, A. C.; SARAIVA, M.; GOMES, M. S. The bone marrow hematopoietic niche and its adaptation to infection. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 112, p. 37–48, abr. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952119302617>>.

GREENBAUM, A. et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. **Nature**, v. 495, n. 7440, p. 227–230, 24 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature11926>>.

GRINFELD, J. et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. **The New England journal of medicine**, v. 379, n. 15, p. 1416–1430, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30304655>>.

GUDLEVICIENE, Z. et al. Quick and effective method of bone marrow mesenchymal stem cell extraction. **Open Medicine**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/med-2015-0008/html>>.

GUGLIEMELLI, P. et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 4, p. 310–318, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2017.76.4886>>.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 1, p. 12, 14 dez. 2011. Disponível em: <<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-12>>.

HOFFMAN, R.; MARCELLINO, B. K. Bone Marrow Microenvironment in Health and Disease. In: **Encyclopedia of Bone Biology**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1–11.

HORKE, S. et al. Paraoxonase-2 Reduces Oxidative Stress in Vascular Cells and Decreases Endoplasmic Reticulum Stress–Induced Caspase Activation. **Circulation**, v. 115, n. 15, p. 2055–2064, 17 abr. 2007. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.681700>>.

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. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324905708276>>.

HULTCRANTZ, M. et al. Risk and Cause of Death in Patients Diagnosed With Myeloproliferative Neoplasms in Sweden Between 1973 and 2005: A Population-Based Study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 20, p. 2288–95, 10 jul. 2015. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.57.6652>>.

IWASAKI, H.; SUDA, T. Cancer stem cells and their niche. **Cancer Science**, v. 100, n. 7, p. 1166–1172, jul. 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2009.01177.x>>.

JACOBSON, L. O. et al. Recovery from Radiation Injury. **Science**, v. 113, n. 2940, p. 510–511, 4 maio 1951. Disponível em:

<<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.113.2940.510>>.

JUNG, Y.-S. et al. Deregulation of CRAD-controlled cytoskeleton initiates mucinous colorectal cancer via  $\beta$ -catenin. **Nature cell biology**, v. 20, n. 11, p. 1303–1314, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30361697>>.

KAIFIE, A. et al. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. **Journal of hematology & oncology**, v. 9, n. 1, p. 18, 5 mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13045-016-0242-9>>.

KASPRZYCKA, M.; HAMMARSTRÖM, C.; HARALDSEN, G. Tenascins in fibrotic disorders—from bench to bedside. **Cell Adhesion & Migration**, v. 9, n. 1–2, p. 83–89, 2 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/19336918.2014.994901>>.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, n. 6, p. 419–425, nov. 2006. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00062752-200611000-00004>>.

KFOURY, Y.; SCADDEN, D. T. Mesenchymal Cell Contributions to the Stem Cell Niche. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 239–253, mar. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590915000752>>.

KLEIN, G.; BECK, S.; MÜLLER, C. A. Tenascin is a cytoadhesive extracellular matrix component of the human hematopoietic microenvironment. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 4, p. 1027–1035, 15 nov. 1993. Disponível em: <<https://rupress.org/jcb/article/123/4/1027/28735/Tenascin-is-a-cytoadhesive-extracellular-matrix>>.

KOKKALIARIS, K. D.; SCADDEN, D. T. Cell interactions in the bone marrow microenvironment affecting myeloid malignancies. **Blood Advances**, v. 4, n. 15, p. 3795–3803, 11 ago. 2020. Disponível em: <<https://ashpublications.org/bloodadvances/article/4/15/3795/461770/Cell-interactions-in-the-bone-marrow>>.

KREIPE, H. et al. Myelofibrosis: molecular and cell biological aspects. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, n. S1, p. S21, 6 dez. 2012. Disponível em: <<https://fibrogenesis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-1536-5-S1-S21>>.

KUMAR, R.; GODAVARTHY, P. S.; KRAUSE, D. S. The bone marrow microenvironment in health and disease at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 4, 2018.

LANDGREN, O. et al. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2199–2204, 2008.

LASHO, T. L. et al. Mayo CALR mutation type classification guide using alpha helix propensity. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 5, p. E128–E129, maio 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.25065>>.

LAURENTI, E.; GÖTTGENS, B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation

landscapes. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 418–426, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature25022>>.

LEFEBVRE, V. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 19, p. 5718–5733, 1 out. 1998. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/17.19.5718>>.

LEFEBVRE, V.; BEHRINGER, R. R.; DE CROMBRUGGHE, B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, p. S69–S75, ago. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458401904479>>.

LEVINE, R. L. et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p. 673–683, set. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc2210>>.

LUCIJANIC, M. et al. Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway Is Dysregulated in Patients With Primary and Secondary Myelofibrosis. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 16, n. 9, p. 523–526, set. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2152265016301094>>.

LUO, B. The Emerging Role of the Hematopoietic Stem Cell Niche in Myeloproliferative Neoplasms. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. 08, n. 03, p. 8–10, 2014.

MAN, Y. et al. Hematopoietic Stem Cell Niche During Homeostasis, Malignancy, and Bone Marrow Transplantation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 22 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.621214/full>>.

MANCO, G.; PORZIO, E.; CARUSONE, T. M. Human Paraoxonase-2 (PON2): Protein Functions and Modulation. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 256, 7 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/10/2/256>>.

MARIE, I.; HERVÉ, F. [Mutation of protein kinase JAK2 in polycythemia vera: new perspectives in physiopathology and therapy]. **La Revue de medecine interne**, v. 27, n. 6, p. 473–7, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631280>>.

MARTINI, V. et al. Cortactin, a Lyn substrate, is a checkpoint molecule at the intersection of BCR and CXCR4 signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia cells. **British journal of haematology**, v. 178, n. 1, p. 81–93, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28419476>>.

MARTY, C. et al. A role for reactive oxygen species in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm progression. **Leukemia**, v. 27, n. 11, p. 2187–2195, 5 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/leu2013102>>.

MARTYRÉ, M.-C. TGF- $\beta$  and Megakaryocytes in the Pathogenesis of Myelofibrosis in Myeloproliferative Disorders. **Leukemia & Lymphoma**, v. 20, n. 1–2, p. 39–44, jan. 1995. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428199509054751>>.

MCPHERSON, S.; MCMULLIN, M. F.; MILLS, K. Epigenetics in Myeloproliferative Neoplasms. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1660–1667, set. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.13095>>.

MEAD, A. J.; MULLALLY, A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. **Blood**, v. 129, n. 12, p. 1607–1616, 2017.

MIROSHNIKOVA, Y. A. et al. Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1 $\alpha$ -tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. **Nature cell biology**, v. 18, n. 12, p. 1336–1345, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27820599>>.

MOHAMEDI, Y. et al. ADAMTS-12: Functions and Challenges for a Complex Metalloprotease. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 30 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.686763/full>>.

MONCADA-PAZOS, A. et al. ADAMTS-12 Metalloprotease Is Necessary for Normal Inflammatory Response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 47, p. 39554–39563, nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820622529>>.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327–34, 16 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429631>>.

MUGHAL, T. I. et al. Myelofibrosis-associated complications: pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. **International journal of general medicine**, v. 7, p. 89–101, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24501543>>.

NAJI, A. et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 17, p. 3323–3348, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>>.

NAKAMURA-ISHIZU, A. et al. Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. **Blood**, v. 119, n. 23, p. 5429–37, 7 jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553313>>.

NG, A. P.; ALEXANDER, W. S. Haematopoietic stem cells: Past, present and future. **Cell Death Discovery**, v. 3, n. December 2016, p. 2–5, 2017.

OHASHI, H. et al. Two rare MPL gene mutations in patients with essential thrombocythemia. **International Journal of Hematology**, v. 90, n. 3, p. 431–432, 2 out. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12185-009-0413-3>>.

OLSON, O. C.; KANG, Y.-A.; PASSEGUÉ, E. Normal Hematopoiesis Is a Balancing Act of Self-Renewal and Regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 12, p. a035519, dez. 2020. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a035519>>.

PARDANANI, A. et al. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. **Leukemia**, v. 21, n. 9, p. 1960–1963, 28 set. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/2404810>>.

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, 2006.

PASSAMONTI, F. et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. **Leukemia**, v. 24, n. 9, p. 1574–1579, 15 set. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/leu2010148>>.

PASSARO, D. et al. CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer cell**, v. 27, n. 6, p. 769–79, 8 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26058076>>.

PAYDAS, S. et al. Survivin and aven: two distinct antiapoptotic signals in acute leukemias. **Annals of Oncology**, v. 14, n. 7, p. 1045–1050, jul. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753420309960>>.

PERCY, M. J.; MCMULLIN, M. F. The V617F JAK2 mutation and the myeloproliferative disorders. **Hematological oncology**, v. 23, n. 3–4, p. 91–3, [s.d.] Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16285006>>.

PICOLI, R. et al. PNS23 epidemiology of myeloproliferative disorders: real world data study in Brazil. **Value in Health Regional Issues**, v. 19, p. S67, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212109919304765>>.

PIKMAN, Y. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1140–1151, 2006.

PINHO, S.; FRENETTE, P. S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 303–320, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0103-9>>.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 2 abr. 1999. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.284.5411.143>>.

POURCELOT, E. et al. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. **Experimental hematology**, v. 42, n. 5, p. 360–8, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463275>>.

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, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28796790>>.

REILLY, J. T. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis, natural history and management. **Blood Reviews**, v. 11, n. 4, p. 233–242, dez. 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X97900229>>.

ROALDSNES, C. et al. Myeloproliferative neoplasms: trends in incidence, prevalence and survival in Norway. **European Journal of Haematology**, v. 98, n. 1, p. 85–93, 2017.

SCHEPERS, K. et al. Myeloproliferative Neoplasia Remodels the Endosteal Bone Marrow Niche into a Self-Reinforcing Leukemic Niche. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 3, p. 285–299, set. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590913002671>>.

SCHEPERS, K.; CAMPBELL, T. B.; PASSEGUÉ, E. Normal and Leukemic Stem Cell Niches: Insights and Therapeutic Opportunities. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 254–267, mar. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590915000703>>.

SCHMITT-GRAEFF, A. H.; NITSCHKE, R.; ZEISER, R. The hematopoietic niche in myeloproliferative neoplasms. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

SEIFFERT, M. et al. Mitogenic and adhesive effects of tenascin-C on human hematopoietic cells are mediated by various functional domains. **Matrix Biology**, v. 17, n. 1, p. 47–63, abr. 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X9890124X>>.

SHAHNAZARI, M. et al. Targeting the Wnt signaling pathway to augment bone formation. **Current Osteoporosis Reports**, v. 6, n. 4, p. 142–148, 25 dez. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11914-008-0025-5>>.

SHALLIS, R. M. et al. Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. **Blood Reviews**, v. 42, p. 100706, jul. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X20300564>>.

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

SKOV, V. et al. Whole-blood transcriptional profiling of interferon-inducible genes identifies highly upregulated IFI27 in primary myelofibrosis. **European journal of haematology**, v. 87, n. 1, p. 54–60, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447007>>.

SMITS, P. et al. Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. **Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 5, p. 747–758, 1 mar. 2004. Disponível em: <<https://rupress.org/jcb/article/164/5/747/33748/Sox5-and-Sox6-are-needed-to-develop-and-maintain>>.

SOINI, Y. et al. Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 3, p. 218–221, 1 mar. 1993. Disponível em: <<http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.46.3.218>>.

SPIECKER, L. et al. Deficiency of Antioxidative Paraoxonase 2 (Pon2) Leads to Increased Number of Phenotypic LT-HSCs and Disturbed Erythropoiesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–18, 25 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2021/3917028/>>.

TEFFERI, A. Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1255–1265, 27 abr. 2000. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200004273421706>>.

TEFFERI, A. et al. Mutations with epigenetic effects in myeloproliferative neoplasms and

recent progress in treatment: Proceedings from the 5th International Post-ASH Symposium. **Blood Cancer Journal**, v. 1, n. 3, p. e7–e7, 4 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bcj20114>>.

TEFFERI, A. et al. One Thousand Patients With Primary Myelofibrosis: The Mayo Clinic Experience. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, n. 1, p. 25–33, jan. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619611000139>>.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 12, p. 1262–1271, 16 dez. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.24592>>.

TEFFERI, A. et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 17, p. 1769–1770, 10 jun. 2018a. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2018.78.9867>>.

TEFFERI, A. et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. **Leukemia**, v. 32, n. 7, p. 1631–1642, 23 jul. 2018b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41375-018-0107-z>>.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis , risk-stratification and management. n. November 2020, p. 145–162, 2021.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 12, p. 1599–1613, 2020.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative Neoplasms. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 1, p. 97, 1 abr. 2015. Disponível em: <<http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2015.89>>.

TEFFERI, A.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms. **Cancer**, v. 115, n. 17, p. 3842–3847, 1 set. 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.24440>>.

THIELE, J. et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. **Haematologica**, v. 90, n. 8, p. 1128–32, ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079113>>.

THYSEN, S.; CAILOTTO, F.; LORIES, R. Osteogenesis induced by frizzled-related protein (FRZB) is linked to the netrin-like domain. **Laboratory Investigation**, v. 96, n. 5, p. 570–580, 29 maio 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/labinvest201638>>.

TIBES, R.; MESA, R. A. Targeting hedgehog signaling in myelofibrosis and other hematologic malignancies. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 7, n. 1, p. 18, 5 dez. 2014. Disponível em: <<https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-7-18>>.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation research**, v. 14, n. 2, p. 213–222, 1961.



TITMARSH, G. J. et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 6, p. 581–587, jun. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.23690>>.

TOGNON, R. et al. A proteomic study of myeloproliferative neoplasms using reverse-phase protein arrays. **Leukemia & Lymphoma**, v. 61, n. 13, p. 3052–3065, 9 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2020.1805110>>.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, v. 13, n. 9, p. 731–740, 27 set. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmeth.3901>>.

VADEIKIENĖ, R. et al. Investigation of mTOR, JAK/STAT, and Hedgehog pathways inhibitor effect on the proliferation of haematological cancer cell lines. **Biologija**, v. 67, n. 2, 8 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.lmaleidykla.lt/ojs/index.php/biologija/article/view/4456>>.

VANNUCCHI, A. M. et al. A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF- $\beta$ 1 in the development of myelofibrosis. **Blood**, v. 105, n. 9, p. 3493–3501, 1 maio 2005. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/105/9/3493/21240/A-pathobiologic-pathway-linking-thrombopoietin>>.

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, 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. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/112/3/844/25317/Characteristics-and-clinical-correlates-of-MPL>>.

VARONE, A. et al. The phosphatase Shp1 interacts with and dephosphorylates cortactin to inhibit invadopodia function. **Cell communication and signaling : CCS**, v. 19, n. 1, p. 64, 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34088320>>.

VELÁZQUEZ-AVILA, M. et al. High cortactin expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with increased transendothelial migration and bone marrow relapse. **Leukemia**, v. 33, n. 6, p. 1337–1348, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30573781>>.

VERMA, D.; KRAUSE, D. S. Targeting the Bone Marrow Niche in Hematological Malignancies. In: [s.l: s.n.]p. 155–175.

VISWANATHAN, S. et al. Soliciting Strategies for Developing Cell-Based Reference Materials to Advance Mesenchymal Stromal Cell Research and Clinical Translation. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 11, p. 1157–1167, jun. 2014. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2013.0591>>.

VON HOLLEBEN, M. et al. Immunoinhibitory adapter protein Src homology domain 3 lymphocyte protein 2 (SLy2) regulates actin dynamics and B cell spreading. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13489–501, 15 abr. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296879>>.

WICKREMA, A. et al. Defective expression of the SHP-1 phosphatase in polycythemia vera. **Experimental hematology**, v. 27, n. 7, p. 1124–32, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390187>>.

WILSON, A. et al. Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. **Cell**, v. 135, n. 6, p. 1118–1129, 2008.

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

WIŚNIEWSKI, J. R.; GAUGAZ, F. Z. Fast and Sensitive Total Protein and Peptide Assays for Proteomic Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 8, p. 4110–4116, 21 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac504689z>>.

WITTE, I. et al. Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer. **Journal of Lipids**, v. 2012, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jl/2012/342806/>>.

WU, H.-T. et al. The Tumor Suppressive Roles and Prognostic Values of STEAP Family Members in Breast Cancer. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–11, 3 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/9578484/>>.

WU, H. et al. miRNA Profiling of Naïve, Effector and Memory CD8 T Cells. **PLoS ONE**, v. 2, n. 10, p. e1020, 10 out. 2007. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0001020>>.

XUE, X. et al. Quantitative proteomics identifies STEAP4 as a critical regulator of mitochondrial dysfunction linking inflammation and colon cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 45, p. E9608–E9617, 7 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1712946114>>.

YAO, J.-C. et al. TGF- $\beta$  Signaling Contributes to Myelofibrosis and Clonal Dominance of Myeloproliferative Neoplasms. **Blood**, v. 134, n. Supplement\_1, p. 470–470, 13 nov. 2019. Disponível em: <[https://ashpublications.org/blood/article/134/Supplement\\_1/470/426388/TGF \$\beta\$ -Signaling-Contributes-to-Myelofibrosis-and](https://ashpublications.org/blood/article/134/Supplement_1/470/426388/TGF%b%b-Signaling-Contributes-to-Myelofibrosis-and)>.

YUAN, L. et al. Identification of a novel AVEN-NUTM1 fusion gene in acute myeloid leukemia. **International journal of laboratory hematology**, v. 43, n. 4, p. O207–O210, ago. 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33755317>>.

ZAHR, A. A. et al. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: Pathogenesis, prognosis and targeted strategies. **Haematologica**, v. 101, n. 6, p. 660–671, 2016.

## ANEXOS

## Anexo A - Classificação do risco segundo o MIPSS 70+ versão 2.0 e o GIPSS

	MIPSS 70+ versão 2.0		GIPSS
	Variáveis genéticas	Variáveis clínicas	Variáveis genéticas (2 pontos)
	Cariótipo VHR (4 pontos)	Anemia severa (2 pontos)	Cariótipo VHR (2 pontos)
	Cariótipo desfavorável (3 pontos)	Anemia moderada (1 ponto)	Cariótipo desfavorável (1 ponto)
	≥ 2 HMR mutações (3 pontos)	Blastos circulantes ≥ 2% (1 ponto)	Tipo 1/like CALR ausente (1 ponto)
	1 HMR mutação (2 pontos)	Sintomas constitucionais (2 pontos)	Mutação ASXL1 (1 ponto)
	Tipo 1/like CALR ausente (1 ponto)		Mutação SRSF2 (1 ponto)
			Mutação U2AF1Q157 (1 ponto)
	Sobrevida mediana		
Risco muito baixo	0 ponto (não alcançado)		
Risco baixo	1-2 pontos (16,4 anos)		0 ponto (26,4 anos)
Risco intermediário-1			1 ponto (8 anos)
Risco intermediário	3-4 pontos (7,7 anos)		
Risco intermediário-2			2 pontos (4,2 anos)
Risco elevado	5-8 pontos (4,1 anos)		≥ 3 pontos (2 anos)
Risco muito elevado	≥ 9 anos (1,8 anos)		

**Fonte:** Adaptado TEFFERI, 2021

MIPSS70+ version 2.0: *mutation and karyotype enhanced international prognostic system*. As cotações de sobrevida são para idade ≤70 anos. GIPSS: *genetically-inspired prognostic scoring system*. As cotações de sobrevida são para todas as faixas etárias. HMR: mutações de alto risco molecular (*high molecular risk mutations*); incluem ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1, IDH2 e adicionalmente, para o GIPSS e o MIPSS70+ versão 2.0. VHR: Cariótipo de risco muito alto (*very high risk karyotype*). Anemia severa: Hemoglobina < 8 g/dl em mulheres e < 9 g/dl em homens. Anemia moderada: Hemoglobina de 8 a 9,9 g/dl em mulheres e de 9-10,9 g/dl em homens.

**Anexo B - Classificação do risco segundo o DIPSS-plus**

<b>Fator de risco</b>	<b>1 ponto</b>	<b>2 pontos</b>
Idade	> 65 anos	
Sintomas constitucionais	presentes	
Hemoglobina		< 10 g/dl
Contagem de leucócitos	> 10 <sup>9</sup> /L	
Blastos circulantes	> 1%	
Contagem de plaquetas	< 100 <sup>9</sup> /L	
Necessidade de transfusão de concentrado de hemácias	sim	
Cariótipo desfavorável	sim	
<b>Grupo de risco</b>	<b>Escore DIPSS-Plus</b>	<b>Sobrevida mediana global</b>
Risco baixo	0	185 meses
Risco intermediário-1	1	78 meses
Risco intermediário-2	2 ou 3	35 meses
Risco alto	≥ 4	16 meses

Fonte: adaptado GANGAT et al, 2012

**Anexo C - Sondas e primers**

<b>Gene</b>	<b>Assay ID</b>
CCL2	Hs00234140_m1
AVEN	Hs00220565_m1
SOX5	Hs00374709_m1
HHIPL2	Hs01548956_m1
FRZB	Hs00173503_m1
KIAA1211	Hs00393402_m1
HAND2	Hs00232769_m1
HAND2-AS1	Hs01047146_m1
STEAP4	Hs01026584_m1
ADAMTS12	Hs00917098_m1
CTTN	Hs01124232_m1
MAP4	Hs01104794_m1
RANBP1	Hs01597912_g1
TNC	Hs01115665_m1
CXCL12	Hs00171022_m1
NFE2L2	Hs00232352_m1

**Anexo D -** Quantificação de reticulina e do colágeno da medula óssea.

Score	Descrição
0	nenhuma fibra de reticulina demonstrável
1	Fibras individuais finas ocasionais e focos de rede de fibras finas
2	Rede de fibra fina em quase toda a seção; sem fibras grossas
3	Rede de fibras difusas com fibras dispersas, grossas e espessas, mas sem colágeno maduro (coloração tricrômica negativa)
4	Rede de fibras difusas, muitas vezes grosseiras, com áreas de colagenização (coloração tricrômica positiva)

Fonte: adaptado (BAUERMEISTER, 1971)

## APÊNDICES

**Apêndice A** - Proteínas diferencialmente expressas nas MSCs de pacientes com TE comparadas com MSCs de indivíduos saudáveis

Proteína	Descrição	CT	TE	Razão TE/CT
BCL2L13	BCL2 like 13	19,44	20,41	1,05
MBOAT7	nicotinamide phosphoribosyltransferase	21,18	22,02	1,04
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	23,02	23,92	1,04
SERPINE1	serpin family E member 1	22,08	22,87	1,04
POFUT1	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	22,09	22,85	1,03
PON2	protein O-fucosyltransferase 1	21,43	22,14	1,03
ASAHI	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	21,26	21,91	1,03
PRKCDBP	peroxiredoxin 4	22,84	23,48	1,03
PKM	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class S	23,01	23,64	1,03
IKBIP	IKBKB interacting protein	23,44	24,03	1,03
PGRMC2	phosphoglucomutase 1	22,82	23,36	1,02
FKBP11	FKBP prolyl isomerase 11	22,38	22,88	1,02
TMEM43	transmembrane protein 43	23,36	23,86	1,02
ITGB1	integrin subunit beta 1	24,8	25,31	1,02
PLOD1	phospholipase B domain containing 2	24	24,49	1,02
ACO2	aconitase 2	22,54	23	1,02
PRDX4	paraoxonase 2	24,63	25,13	1,02
GLS	glutaminase	24,16	24,64	1,02
MMS19	niban apoptosis regulator 2	19,96	20,35	1,02
PGM1	platelet derived growth factor receptor beta	23,44	23,89	1,02
PLBD2	pyruvate kinase M1/2	22,06	22,48	1,02
UFL1	UFM1 specific ligase 1	20,88	21,27	1,02
CKAP4	CD59 molecule (CD59 blood group)	26,1	26,58	1,02
LMAN1	leucine rich repeat containing 59	24,8	25,25	1,02
LEPRE1	lectin, mannose binding 1	23,82	24,25	1,02
CNPY2	cytoskeleton associated protein 4	21,98	22,39	1,02
NT5C2	prolyl 3-hydroxylase 1	19,44	19,8	1,02
CD59	caveolae associated protein 3	24,87	25,32	1,02
CYB5R3	cathepsin D	24,97	25,41	1,02
THY1	Thy-1 cell surface antigen	25,63	26,08	1,02
TNPO1	transportin 1	22,4	22,78	1,02
FAM129B	endoplasmic reticulum protein 44	23	23,38	1,02
NSF	5'-nucleotidase, cytosolic II	21,92	22,27	1,02
HADHB	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta	23,06	23,42	1,02
KPNA4	karyopherin subunit alpha 4	22,36	22,7	1,02
TOMM70A	translocase of outer mitochondrial membrane 70	21,48	21,8	1,02
USP5	ubiquitin specific peptidase 5	22,05	22,38	1,01

CTSD	COPI coat complex subunit gamma 1	24,99	25,36	1,01
ERP44	EH domain containing 1	23,28	23,61	1,01
COMT	canopy FGF signaling regulator 2	23,3	23,62	1,01
LEPREL2	LIM and cysteine rich domains 1	21,89	22,2	1,01
ANXA1	annexin A1	26,78	27,15	1,01
CAPN2	calpain 2	23,93	24,25	1,01
ATP5J2-PTCD1	ATP5MF-PTCD1 readthrough	21,14	21,41	1,01
SEC24D	SEC24 homolog D, COPII coat complex component	22,78	23,06	1,01
EHD1	dynactin subunit 1	22,56	22,83	1,01
IARS2	isoleucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	21,79	22,05	1,01
FKBP9	FKBP prolyl isomerase 9	23,16	23,43	1,01
ATL3	atlastin GTPase 3	23,29	23,56	1,01
VCP	valosin containing protein	24,99	25,28	1,01
DCTN1	cytochrome b5 reductase 3	22,63	22,86	1,01
UQCRC2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2	23,06	23,3	1,01
HERC4	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4	23,29	23,52	1,01
APMAP	adipocyte plasma membrane associated protein	23,34	23,57	1,01
LRRC59	MMS19 homolog, cytosolic iron-sulfur assembly component	24,81	25,04	1,01
CAPZA1	capping actin protein of muscle Z-line subunit alpha 1	24,61	24,83	1,01
PIGS	progesterone receptor membrane component 2	19,08	19,25	1,01
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	24,86	25,05	1,01
ANXA5	annexin A5	27,09	27,3	1,01
COPG1	catechol-O-methyltransferase	23,52	23,69	1,01
SEPT7	septin 7	23,8	23,97	1,01
CAND1	cullin associated and neddylation dissociated 1	23,28	23,44	1,01
AP2A1	adaptor related protein complex 2 subunit alpha 1	22,8	22,94	1,01
GBP1	guanylate binding protein 1	22,01	21,86	0,99
ILK	integrin linked kinase	22,79	22,57	0,99
NAMPT	N-ethylmaleimide sensitive factor, vesicle fusing ATPase	21,78	21,56	0,99
CAP1	cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1	25,71	25,33	0,99
RAC1	Rac family small GTPase 1	23,93	23,56	0,98
ANP32E	acidic nuclear phosphoprotein 32 family member E	21,87	21,24	0,97
HMGB1	high mobility group box 1	25,28	24,52	0,97
RANBP1	RAN binding protein 1	23,27	22,46	0,97
LMCD1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 7	22,18	21,34	0,96
PDGFRB	prolyl 3-hydroxylase 3	22,19	20,92	0,94

CT: Controles

Os valores apresentados são a média do valor de fluorescência normalizada (NFQ) transformado em log (2), obtidos por espectrometria de massa para cada proteína e analisados no software Perseus.

A razão TE/CT refere-se aos valores de NFQ das amostras de TE divididos pelo valor de NFQ das amostras CT. Valores acima de 1 são proteínas mais expressas em TE e valores abaixo de 1 são proteínas menos expressas em TE.

**Apêndice B - Proteínas diferencialmente expressas nas MSCs de pacientes com Policitemia Vera (PV) comparadas com MSCs de indivíduos saudáveis**

<b>Nomes dos genes</b>	<b>Descrição</b>	<b>Média-CT</b>	<b>Média- PV</b>	<b>PV/CT</b>
CTTN	cortactin	20,71	23,23	<b>1,12</b>
PDLIM1	perilipin 3	20,59	22,98	<b>1,12</b>
MAP4	matrin 3	22,02	24,53	<b>1,11</b>
CALD1	caldesmon 1	23,29	25,80	<b>1,11</b>
MARCKS	NIMA related kinase 7	20,93	22,92	<b>1,09</b>
TPD52L2	VPS35 retromer complex component	21,85	23,69	<b>1,08</b>
ZYX		22,85	24,67	<b>1,08</b>
CAP2	calpain 1	20,81	22,32	<b>1,07</b>
PSAP	proteasome 20S subunit beta 3	20,32	21,79	<b>1,07</b>
EIF4H	fibrillarlin	21,71	23,21	<b>1,07</b>
GSN	glutathione synthetase	22,69	24,21	<b>1,07</b>
LASP1	microtubule associated protein RP/EB family member 1	22,99	24,48	<b>1,06</b>
CNN3	calponin 3	24,23	25,78	<b>1,06</b>
MAPRE1	mercaptopyruvate sulfurtransferase	22,78	24,22	<b>1,06</b>
PDLIM4	protein O-glucosyltransferase 3	21,63	22,94	<b>1,06</b>
DBNL	drebrin like	21,26	22,55	<b>1,06</b>
BCL2L13	BCL2 like 13	19,44	20,52	<b>1,06</b>
ASAHI	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	21,26	22,41	<b>1,05</b>
CALD1	cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 2	26,08	27,47	<b>1,05</b>
VASP		22,41	23,60	<b>1,05</b>
TMOD3	ubiquitin C	21,43	22,53	<b>1,05</b>
GSN	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4	24,43	25,68	<b>1,05</b>
LIMA1	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	22,81	23,96	<b>1,05</b>
STAT1	transmembrane p24 trafficking protein 7	23,02	24,14	<b>1,05</b>
PDLIM5	POTE ankyrin domain family member E	24,02	25,14	<b>1,05</b>
HSPE1;HSPE1-MOB4	interleukin enhancer binding factor 3	22,46	23,47	<b>1,04</b>
CTSB	cathepsin B	25,20	26,20	<b>1,04</b>
TAGLN2	translocase of outer mitochondrial membrane 40	25,37	26,29	<b>1,04</b>
NEK7	oxidative stress responsive kinase 1	22,57	23,32	<b>1,03</b>
CNN2	calponin 2	23,78	24,55	<b>1,03</b>
MPST	Obg like ATPase 1	20,94	21,60	<b>1,03</b>
AKR1A1	aldo-keto reductase family 1 member A1	22,21	22,89	<b>1,03</b>
GSS	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	22,14	22,81	<b>1,03</b>
NT5E	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase	22,75	23,40	<b>1,03</b>



POTEE;POTEI;POTEJ	pre-mRNA processing factor 19	24,82	25,52	<b>1,03</b>
PRDX5	prosaposin	23,29	23,90	<b>1,03</b>
PLIN3	peroxiredoxin 5	24,50	25,09	<b>1,02</b>
UBC;UBB;RPS27A;UBA52		26,29	26,92	<b>1,02</b>
TAGLN	tropomodulin 3	28,44	29,09	<b>1,02</b>
CSRPI	cysteine and glycine rich protein 1	25,52	26,10	<b>1,02</b>
PTRF	ribosomal protein L13a	25,11	25,68	<b>1,02</b>
OXSRI	PDZ and LIM domain 4	20,74	21,17	<b>1,02</b>
PCMT1	PDZ and LIM domain 5	22,23	22,67	<b>1,02</b>
RAB23	ribosomal protein L15	21,72	22,14	<b>1,02</b>
HERC4	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	23,29	23,72	<b>1,02</b>
PSMA2	proteasome 26S subunit, ATPase 5	22,89	23,30	<b>1,02</b>
GLO1	GDP-mannose pyrophosphorylase A	23,16	23,57	<b>1,02</b>
ANXA1	annexin A1	26,78	27,25	<b>1,02</b>
KDEL2	LIM domain and actin binding 1	21,57	21,92	<b>1,02</b>
VCP		24,99	25,39	<b>1,02</b>
OLA1	PDZ and LIM domain 1	22,24	22,58	<b>1,02</b>
TWF2	zyxin	22,91	23,26	<b>1,02</b>
CTSA	cathepsin A	22,78	23,12	<b>1,02</b>
SEC31A	signal transducer and activator of transcription 1	23,29	23,63	<b>1,01</b>
PSMD11	RAB23, member RAS oncogene family	23,11	23,43	<b>1,01</b>
SEPT9	transgelin	22,84	23,15	<b>1,01</b>
PSMD13	RNA binding motif protein 3	22,59	22,90	<b>1,01</b>
VPS35		23,12	23,40	<b>1,01</b>
PSMC5	proteasome 26S subunit, non-ATPase 13	22,60	22,87	<b>1,01</b>
PSMB3	proteasome 26S subunit, non-ATPase 11	23,08	23,27	<b>1,01</b>
DNAH7	enoyl-CoA hydratase 1	26,00	25,69	<b>0,99</b>
CAPN1	caveolae associated protein 1	23,47	23,12	<b>0,99</b>
ILF3	KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 1	23,96	23,58	<b>0,98</b>
GART	glyoxalase I	22,19	21,81	<b>0,98</b>
ARL8B;ARL8A	ADP ribosylation factor like GTPase 8B	22,77	22,35	<b>0,98</b>
ILF2	integrin subunit alpha 11	23,25	22,79	<b>0,98</b>
EIF3I	eukaryotic translation initiation factor 4H	22,81	22,36	<b>0,98</b>
GMPPA	gelsolin	21,97	21,52	<b>0,98</b>
ECH1	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	21,66	21,14	<b>0,98</b>
FBL	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase	22,14	21,54	<b>0,97</b>
RPS8	septin 9	24,83	24,16	<b>0,97</b>
AP1M1	adaptor related protein complex 1 subunit mu 1	20,71	20,15	<b>0,97</b>
RPS27L	ribosomal protein S8	23,39	22,71	<b>0,97</b>
HNRNPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	24,88	24,14	<b>0,97</b>
RPL18A	ribosomal protein L3	23,37	22,67	<b>0,97</b>

TMED7;TMED7-TICAM2	twinfilin actin binding protein 2	23,71	23,00	<b>0,97</b>
RBM3	ribosomal protein L18a	21,97	21,28	<b>0,97</b>
RPS3	ribosomal protein S9	25,32	24,49	<b>0,97</b>
COPE	COPI coat complex subunit epsilon	22,37	21,62	<b>0,97</b>
DHX15	DEAH-box helicase 15	21,39	20,66	<b>0,97</b>
RPL30	ribosomal protein S11	23,46	22,65	<b>0,97</b>
HNRNPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	23,17	22,37	<b>0,97</b>
RPL21	ribosomal protein L30	24,23	23,34	<b>0,96</b>
RPL4	ribosomal protein S27 like	25,30	24,37	<b>0,96</b>
RPS7	SEC31 homolog A, COPII coat complex component	24,79	23,87	<b>0,96</b>
HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	24,24	23,33	<b>0,96</b>
HNRNPU	interleukin enhancer binding factor 2	24,76	23,82	<b>0,96</b>
ITGA11	LIM and SH3 protein 1	23,41	22,52	<b>0,96</b>
RPL8	ribosomal protein S3	24,78	23,83	<b>0,96</b>
RPS11	ribosomal protein S7	24,30	23,33	<b>0,96</b>
TOMM40	valosin containing protein	20,83	19,99	<b>0,96</b>
KHDRBS1	microtubule associated protein 4	23,80	22,81	<b>0,96</b>
AP3B1	adaptor related protein complex 3 subunit beta 1	22,25	21,31	<b>0,96</b>
RPS9	splicing factor proline and glutamine rich	24,75	23,67	<b>0,96</b>
HNRNPM	heat shock protein family E (Hsp10) member 1	23,47	22,35	<b>0,95</b>
RPL15	ribosomal protein L26	24,29	23,12	<b>0,95</b>
MATR3	5'-nucleotidase ecto	22,06	20,98	<b>0,95</b>
SFPQ	transgelin 2	24,24	23,01	<b>0,95</b>
RPL3	ribosomal protein L8	24,71	23,37	<b>0,95</b>
PRPF19	proteasome 20S subunit alpha 2	22,36	21,06	<b>0,94</b>
RPL26;RPL26L1	ribosomal protein L4	24,30	22,84	<b>0,94</b>
RPL13a;RPL13A;RPL13AP3	ribosomal protein L21	24,55	22,55	<b>0,92</b>
DHX9	dynein axonemal heavy chain 7	23,01	21,09	<b>0,92</b>
TGFBI	TPD52 like 2	23,08	21,01	<b>0,91</b>
TNC	vasodilator stimulated phosphoprotein	22,86	18,70	<b>0,82</b>

CT: Controles

Os valores apresentados são a média do valor de fluorescência normalizada (NFQ) transformado em  $\log(2)$ , obtidos por espectrometria de massa para cada proteína e analisados no software Perseus.

A razão PV/CT refere-se aos valores de NFQ das amostras de PV divididos pelo valor de NFQ das amostras CT. Valores acima de 1 são proteínas mais expressas em PV e valores abaixo de 1 são proteínas menos expressas em PV.

**Apêndice C** - Genes diferencialmente expressos na análise *in silico* em MSC-MFP versus MSC-Controles saudáveis

<b>ID</b>	<b>Gene, símbolo</b>	<b>Gene, título</b>	<b>log2(fold change)</b>
11866	PDE11A	phosphodiesterase 11A	4,09
19848	<b>ADAMTS12</b>	<b>ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 12</b>	<b>2,27</b>
10328	<b>AVEN</b>	<b>apoptosis and caspase activation inhibitor</b>	<b>1,12</b>
39315	FASN	fatty acid synthase	1,03
13645	GARNL3	GTPase activating Rap/RanGAP domain like 3	-1,94
15891	IL4	interleukin 4	-2,06
22760	LINC02731	LINC02731	-2,40
40647	<b>CRACD</b>	<b>CRACD (ALIAS KIAA 1211)</b>	<b>-2,43</b>
17024	<b>FRZB</b>	<b>frizzled-related protein</b>	<b>-2,48</b>
12989	MAPK10	mitogen-activated protein kinase 10	-2,59
24660	KCNB1	potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	-2,64
11668	<b>HHIPL2</b>	<b>HHIP like 2</b>	<b>-2,86</b>
22170	NANOS1	nanos C2HC-type zinc finger 1	-2,86
41078	IRX6	iroquois homeobox 6	-3,20
14199	LHX9	LIM homeobox 9	-3,22
13404	NPTX2	neuronal pentraxin 2	-4,16
39645	LINC01109	long intergenic non-protein coding RNA 1109	-4,23
33802	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	-4,23
38313	<b>STEAP4</b>	<b>STEAP4 metalloreductase</b>	<b>-4,28</b>
17471	BARX1	BARX homeobox 1	-4,65
35314	<b>SOX5</b>	<b>SRY-box 5</b>	<b>-4,84</b>
7836	<b>HAND2-AS1</b>	<b>HAND2 antisense RNA 1 (head to head)</b>	<b>-6,74</b>
10182	<b>HAND2</b>	<b>heart and neural crest derivatives expressed 2</b>	<b>-7,12</b>