

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIA DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

FABIO RODRIGO BARBOSA DUTRA NASCIMENTO

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *MMP2* E *MMP9* COM
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

Recife
2019

FABIO RODRIGO BARBOSA DUTRA NASCIMENTO

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *MMP2* E *MMP9* COM
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Co-orientador: Prof.Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

N244a Nascimento, Fabio Rodrigo Barbosa Dutra
Associação dos polimorfismos nos genes *MMP2* e *MMP9* com características clínicas e laboratoriais de pacientes com neoplasias mieloproliferativas / Fabio Rodrigo Barbosa Dutra Nascimento. – 2019.
64 f.; il.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto .
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Patologia. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Doenças hematológicas. 2. Doenças da medula óssea. 3. Transtornos mieloproliferativos. 4. Metaloproteinase 2 da matriz. 5. Metaloproteinase 9 da matriz. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Araújo, Antônio Roberto Lucena de (Coorientador). III. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 277)

FABIO RODRIGO BARBOSA DUTRA NASCIMENTO

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *MMP2* E *MMP9* COM
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovada em: 26/08/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Pablo Ramón Cardoso Gualberto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha avó Adélia, entusiasta e admiradora da ciência, que não pôde contemplar em vida a realização desse mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a Nossa Senhora da Conceição pelas oportunidades.

Aos meus pais e minha família, que não mediram esforços na minha educação e proveram um lar de amor e respeito que permitiu minha formação pessoal.

A Sara, minha namorada, que sempre me apoiou e me ajudou nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, que sempre me apóiam, bebem comigo como se não houvesse amanhã e geram inúmeros momentos de felicidade.

Ao professor Dr. Marcos André, quem primeiro abriu as portas do laboratório de hematologia na graduação e na pós-graduação. Além de um amigo e exemplo profissional.

Aos meus orientadores, em especial o professor Dr. Antônio Roberto, que me recebeu de braços abertos, me incentivou e me guiou durante o mestrado. Além disso, pude desfrutar de sua amizade e de bons momentos de descontração.

Aos companheiros de laboratório, com quem compartilhei experiências e ensinamentos nos últimos dois anos. Um abraço carinhoso em Aleide, Jessica, Pedro (Peu), Guilhermy, Aída, Igor e Matheus. Além dos funcionários do LabCen que sempre me trataram bem (Dona Carmem, Patrícia e Edwards).

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela oportunidade de viver a experiência do mestrado e contribuir com a minha formação.

Aos pacientes e funcionários do HEMOPE pelo carinho e consideração comigo.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A todos, que direta ou indiretamente, me conduziram mais uma vez a UFPE e a este momento tão especial.

RESUMO

Neoplasias mieloproliferativas (NMP) cromossomo Filadelfia (Ph) negativo englobam principalmente Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose (MF). Estas são malignidades hematológicas que surgem da proliferação clonal de células tronco neoplásicas na medula óssea e que compartilham de características fisiopatológicas e clínicas comuns. As metaloproteinases de matriz, por sua vez, são enzimas proteolíticas capazes de remodelar a matriz extracelular (MEC) ativando citocinas e fatores de crescimento que atuam em vias de sinalização tanto na homeostase como na carcinogênese. Com o objetivo de avaliar o papel das metaloproteinases nas NMP, foram investigados dois polimorfismos de base única nos genes *MMP2* e *MMP9* e suas possíveis associações com as características clínicas das doenças. O estudo foi do tipo análise exploratória. Foram analisados 293 pacientes, sendo 75 de PV, 165 de TE e 53 de MF. As genotipagens dos polimorfismos rs243865(C>T) e rs17576(A>G) foram realizadas por meio da técnica de PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan. Empregando-se o modelo genético de herança dominante, nos homozigotos ancestrais (CC), foram encontradas associações significantes do polimorfismo rs243865, do gene *MMP2*, com maior frequência de sangria ($p=0,041$) em pacientes de PV e com hiperplaquetose ($p=0,012$) em pacientes de TE. O polimorfismo rs17576, do gene *MMP9*, também se mostrou associado a achados clínicos relevantes como prurido ($p=0,002$) em PV e a maior frequência de necessidade transfusional ($p=0,019$) em pacientes de MF, ambos para o genótipo AG, utilizando-se do modelo codominante. Nossos resultados revelaram associações significativas entre polimorfismos nos genes *MMP2* e *MMP9* com manifestações clínicas de pacientes com NMP podendo ser uma ferramenta útil no manejo destes pacientes.

Palavras-chave: Doenças hematológicas. Doenças da medula óssea. Transtornos mieloproliferativos. Metaloproteinase 2 da matriz. Metaloproteinase 9 da matriz.

ABSTRACT

Philadelphia (Ph) negative myeloproliferative neoplasms (MPN) mainly comprise Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (TE) and Myelofibrosis (MF). These are haematological malignancies that arise from the clonal proliferation of neoplastic stem cells in the bone marrow and share common pathophysiological and clinical features. Matrix metalloproteinases, in turn, are proteolytic enzymes capable of remodeling extracellular matrix (ECM) activating cytokines and growth factors that act on signaling pathways in both homeostasis and carcinogenesis. In order to evaluate the role of metalloproteinases in MPN, two single base polymorphisms in the *MMP2* and *MMP9* genes and their possible associations with the clinical characteristics of the diseases were investigated. The study was exploratory analysis. There were analyzed 293 patients, 75 from PV, 165 from TE and 53 from MF. Genotyping of the rs243865(C>T) and rs17576 (A>G) polymorphisms was performed by real-time PCR using TaqMan probes. Using the dominant inheritance genetic model in ancestral homozygotes (CC), significant associations of the rs243865 polymorphism of the *MMP2* gene were found, with higher phlebotomy frequency ($p = 0.041$) in PV patients and extreme thrombocytosis ($p = 0.012$) in TE patients. The rs17576 polymorphism of the *MMP9* gene was also associated with relevant clinical findings such as pruritus ($p = 0.002$) in PV and the higher frequency of transfusion need ($p = 0.019$) in MF patients, both for the AG genotype, using is the codominant model. Although these findings still need to be replicated in other cohorts, our results revealed significant associations between *MMP2* and *MMP9* gene polymorphisms with clinical manifestations of patients with MPN.

Keywords: Hematologic diseases. Bone marrow diseases. Myeloproliferative disorders. Matrix metalloproteinases 2. Matrix metalloproteinase 9.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fisiopatologia da JAK2 nas NMPC.....	20
Figura 2- Representação da fisiopatologia do receptor MPL nas NMPC Ph-negativo.....	23
Figura 3- Imagem representativa da estrutura molecular geral da metaloproteinase de matriz.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação das malignidades mielóides, segundo Organização Mundial da Saúde 2016.....	17
Tabela 2-	Critérios diagnósticos de Policitemia Vera de acordo com a OMS 2016.....	25
Tabela 3-	Critérios diagnósticos para Trombocitemia essencial, de acordo com OMS 2016.....	26
Tabela 4-	Critérios diagnósticos de Mielofibrose (pré-fibrotótica) de acordo com a OMS 2016	28
Tabela 5-	Critérios diagnósticos da mielofibrose (fase fibrótica) de acordo com OMS 2016.....	29
Tabela 6-	Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose incluídos no estudo.....	39
Tabela 7-	Frequências genotípicas e alélicas de pacientes com policitemia vera.....	40
Tabela 8-	Frequências genotípicas e alélicas de pacientes com trombocitemia essencial.....	40
Tabela 9-	Frequências genotípicas e alélicas de pacientes com mielofibrose primária.....	41
Tabela 10-	Modelo dominante de herança genética para o polimorfismo rs243865 em pacientes com policitemia vera.....	41
Tabela 11-	Modelo dominante de herança genética para o polimorfismo rs243865 em pacientes com trombocitemia essencial.....	43
Tabela 12-	Modelo dominante de herança genética para o polimorfismo rs243865 em pacientes com mielofibrose.....	44
Tabela 13-	Modelo co-dominante de herança genética para o polimorfismo rs17576 em pacientes com policitemia vera.....	46
Tabela 14-	Modelo co-dominante de herança genética para o polimorfismo rs17576 em pacientes com trombocitemia essencial.....	48
Tabela 15-	Modelo co-dominante de herança genética para o polimorfismo rs17576 em pacientes com mielofibrose.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

BCR/ABL1	Gene de fusão resultante do cromossomo Filadélfia
CALR	Gene da Calreticulina
CEP	Comitê de ética em Pesquisa
dL	Decilitro
DIPSS	DynamicInternationalScoring System
DNMT	Gene da DNA metiltransferase
EDTA	Ácido Etileno-diaminotetracético
EPO	Eritropoietina
EPOR	Receptor de eritropoetina
HEMOPE	Fundação de Hematologia de Pernambuco
Hb	Hemoglobina
JAK2	Gene Janus quinase2
KCl	Cloreto de potássio
LLA	Leucemia linfóide Aguda
LLC	LeucimaLinfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MEC	Matriz Extracelular
MF	Mielofibrose
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MMP	Metaloproteinase de Matriz
<i>MMP</i>	Gene da Metaloproteinase de Matriz
MO	Medula óssea
MPL	Gene do receptor de trombopoetina
NaCl	Cloreto de Sódio
NMP	Neoplasia Mieloproliferativa Crônica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	OddsRatio
PV	Policitemia Vera

RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásica
TE	Trombocitemia Essencial
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TPO	Trombopoetina
TPOR	Receptor de trombopoetina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS	16
2.2	PATOGÊNESE E ASPECTOS MOLECULARES DAS NMP PH NEGATIVAS.....	17
2.2.1	As mutações no gene JAK2	18
2.2.2	Influência alélica da mutação V617F	21
2.2.3	Mutação no gene CALR	22
2.2.4	Mutação no gene MPL.....	22
2.3	POLICITEMIA VERA (PV).....	24
2.4	TROMBOCITEMIA ESSENCIAL	25
2.5	MIELOFIBROSE PRIMÁRIA	26
2.6	METALOPROTEINASES DE MATRIZ: FISIOLOGIA E CARCINOGENESE	29
2.7	METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 NAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	CASUÍSTICA.....	35
4.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	35
4.3	MÉTODOS DE COLETA	35
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	35
4.5	ANÁLISES MOLECULARES DOS POLIMORFISMOS	36
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	GENOTIPAGEM DOS GENES MMP2 E MMP9	40
5.2	ASSOCIAÇÕES DOS SNPS COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM PV, TE E MF	41
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÃO	56

REFERÊNCIA	57
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MAIORES DE 18 ANOS (Resolução 466/12).....	62
APÊNDICE B- CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO.....	63
ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	64

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) referem-se a um grupo heterogêneo de doenças das células sanguíneas mielóides, que surgem a partir de uma transformação clonal da célula tronco hematopoiética. Além disso, se caracterizam pelo aumento na produção e persistência de células maduras no sangue periférico (TEFFERI, 2016; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017a).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece sete entidades de NMP distintas. Porém, em termos práticos, as NMP estão divididas em dois grupos de acordo com a presença do cromossomo Filadélfia (Ph). Dentre aquelas que não possuem o cromossomo Filadélfia (Ph-), três se destacam por suas frequências, são elas: a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose (MF) e que são abordadas no presente estudo (ARBER et al., 2016).

Embora sejam entidades clínicas diferentes, as NMP (PV, TE e MFP) possuem relação entre si, e ainda, características comuns, como a hipercelularidade da medula óssea, tendências hemorrágicas, episódios de trombose, organomegalia secundária à hematopoese extramedular, risco de transformação para leucemia aguda e falência medular (BARBUI et al., 2011).

Os mecanismos moleculares envolvidos da patogênese das NMP ainda não são totalmente elucidados. Porém, algumas alterações genéticas, como a mutação JAK2V617F, que ocorre no gene JAK2, está presente em cerca de 90% dos casos de PV e em 50% dos casos de TE e MFP. Outras alterações são as mutações nos genes CALR e MPL. De forma geral, essas mutações promovem um crescimento e proliferação celular independente de citocinas pois atuam, principalmente, em vias de transdução de sinal que permanecem constitutivamente ativadas (RUMI, 2016).

A matriz extracelular (MEC) deixou de ser considerada apenas uma estrutura inerte, constituída por proteínas e polissacarídeos voltadas para o preenchimento do espaço extracelular pois este microambiente influencia e fornece as condições adequadas para o crescimento e diferenciação das células por meio de vias de sinalização que podem atuar tanto na homeostase como em processos patológicos. Particularmente no microambiente hematopoético, a MEC possui funções importantes como a ancoragem das células e sua diferenciação em progenitores mielóides e linfóides que vão originar todas as células sanguíneas, garantindo a hematopoese (KLEIN; SCHMAL; AICHER, 2015)

As metaloproteinases de matriz (MMP) 2 e 9, classificadas como gelatinases, são enzimas proteolíticas capazes de degradar tecidos conectivos. Atuam principalmente na degradação da MEC e possuem várias funções em diferentes sistemas, participando da migração celular organogênese, apoptose, inflamação, imunidade e angiogênese (SAVASOGLU; ERDAL, 2016).

A superexpressão das proteínas MMP-2 e MMP-9 têm sido descritas em vários tipos de câncer e relacionadas ao pior prognóstico pelo seu envolvimento na invasão e metástase de células malignas em tumores sólidos. No entanto, nas malignidades hematológicas, essa relação não está bem estabelecida devido a pouca literatura acerca da temática. Por isso é difícil saber o real papel das associações polimórficas, assim como da expressão das MMP e seus inibidores na medula óssea, durante a diferenciação hematopoética e transformação leucêmica (CHAUDHARY et al., 2013, 2016a)

Sendo assim, este trabalho se prontifica a estudar variantes dos genes *MMP2* e *MMP9* e suas associações com fenótipos de pacientes acometidos com neoplasias mieloproliferativas crônicas. Tais associações podem contribuir com a literatura e o papel desses genes nas características clínicas desses indivíduos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

Neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMP) pertencem a um grupo heterogêneo de desordens clonais, originadas na célula tronco hematopoiética, caracterizadas pelo aumento da produção, independente de estímulos fisiológicos, de células maduras da linhagem mielóide no sangue periférico (SKODA; DUEK; GRISOUARD, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece sete entidades de NMP distintas: a Leucemia Mielóide Crônica (LMC), a Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MF), Leucemia Neutrófila Crônica, Leucemia Eosinófila Crônica, e Neoplasia Mieloproliferativa Inclassificável, (WHO, 2016; ARBER et al., 2016; TEFFERI; PARDANANI, 2016). Em termos práticos, as NMP estão divididas em dois grupos de acordo com a presença do cromossomo Filadélfia (Ph) $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ou do gene de fusão resultante BCR-ABL1 em: BCR-ABL positiva, que inclui a leucemia mielóide crônica (LMC) e as BCR-ABL negativas, as quais a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MF) representam os três maiores subtipos chamadas NMP clássicas e que são abordadas no presente estudo (ARBER et al., 2016).

Embora sejam entidades clínicas distintas, as NMP possuem relação entre si, e também compartilham de características como hiperplasia da medula óssea, organomegalia, aumento na incidência de eventos trombóticos e hemorrágicos, além do risco de transformação leucêmica e falência medular (GRINFELD; NANGALIA; GREEN, 2017; RUMI, 2016).

A PV e a ET são doenças relativamente indolentes, associadas a uma modesta redução da expectativa média de vida dos indivíduos acometidos. Contudo, a maioria dos doentes acaba por ter uma ou mais complicações graves e potencialmente fatais diretamente atribuídas à doença. Por outro lado, a MF tem uma evolução mais severa na maioria dos casos e a sobrevida é significativamente afetada (HARRISON et al., 2017).

As NMP Ph negativas são patologias essencialmente do adulto (50-70 anos), estando entre as neoplasias hematológicas mais frequentes (VANNUCCHI et al., 2009). Apesar de poder surgir em qualquer faixa etária, a incidência aumenta com a

idade, sendo 60 anos a média de idade ao diagnóstico(VANNUCCHI; HARRISON, 2017).

No Brasil, não existem dados epidemiológicos com relação a cada NMP, mas segundo a literatura, a PV possui incidência anual de 0,7-2,6 casos por 100.000 habitantes. A TE possui incidência anual de 0,2 a 2,27 casos a cada 100.000. A MF tem incidência de 0,1 a 1,0 casos para cada 100.000 habitantes/ano e pode ocorrer *de novo*, ou como resultado de progressão da PV ou TE (MF pós-PV/TE), sem diferenças clínicas ou histológicas entre elas (LIMA, 2016; TEFFERI, 2016).

Tabela 1- Classificação das malignidades mielóides, segundo a Organização Mundial da Saúde 2016.

Leucemia Mielóide Crônica (BCR-ABL1+)	
Leucemia Neutrófila Crônica (LNC)	
Policitemia Vera	
Trombocitemia Essencial	
Mielofibrose Primária	a) Fase pré- fibrótica b) Fase fibrótica
Leucemia Eosinofílica Crônica (LEC)	
Neoplasia Mieloproliferativa Inclassificável	

Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

2.2 PATOGÊNESE E ASPECTOS MOLECULARES DAS NMP PH NEGATIVAS

As neoplasias mieloproliferativas são originadas na medula óssea, a partir da proliferação de precursores mielóides e são caracterizadas basicamente pelo aumento da produção de células sanguíneas maduras de uma ou mais linhagens. Embora o mecanismo fisiopatológico completo deste grupo de doenças não seja totalmente elucidado, sabe-se que as entidades PV, TE e MF surgem de uma mutação somática de uma célula tronco hematopoética que sofre expansão clonal com poder de diferenciação (NANGALIA; GREEN, 2017)

A expansão clonal desta célula tronco é acompanhada de hiperplasia de uma ou várias linhagens mielóides. A PV, por exemplo, é caracterizada não somente pelo aumento de eritrócitos e envolvimento da linhagem eritróide mas também está associada com aumento de componentes das linhagens megacariocíticas e/ou granulocíticas (panmielose). A TE, por sua vez, se caracteriza pelo aumento do número de plaquetas com hiperplasia megacariocítica e a MF, a mais heterogênea

do ponto de vista clínico e biológico, pode se apresentar inicialmente com expansão da série granulocítica e hiperplasia megacariocítica e posteriormente com fibrose medular(ALSHEMMARI; RAJAN; EMADI, 2016a; GUGLIELMELLI et al., 2014; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017b).

Mutações somáticas são responsáveis pela expansão clonal não só nas NMP mas em outras malignidades mielóides. No entanto, alguns desses genes estão associados às neoplasias mieloproliferativas, são mutuamente excludentes e são conhecidas como mutações condutoras, são elas: JAK2V617F, JAK2 éxon 12, MPL e CALR. São assim denominadas devido ao seu papel em conduzir o fenótipo das neoplasias mieloproliferativas, convergindo para ativação constitutiva da via JAK-STAT, promovendo uma hematopoese autônoma (SKODA; DUEK; GRISOUARD, 2015; SPIVAK, 2017).

2.2.1 As mutações no gene JAK2

A JAK2 pertence à família de *Janus cinases* (tirosina quinase não receptoras que são componentes integrais da sinalização por citocinas e fatores de crescimento), e é um dos sinalizadores intermediários da hematopoese (JACQUES; SCHROYENS, 2015).

As proteínas JAK têm dois domínios cinase-like (JH1 e JH2), sendo que apenas o domínio JH1 tem atividade enzimática. O JH2 ou pseudocinase é um regulador negativo da atividade da cinase, sendo que esta função auto-inibitória é perdida com a mutação JAK2V617F. Esta mutação resulta da substituição do nucleotídeo G por T na posição 1849 do éxon 14, ocorrendo alteração de valina para fenilalanina no códon 617. Esta ocorre ao nível da célula estaminal primitiva e resulta na perda de função do domínio JH2, com perda do controle inibitório da JAK2, conferindo uma capacidade de resposta aumentada às citocinas e sinalização independente das citocinas, levando assim à ativação de múltiplas cascatas de sinalização, como as das proteínas STAT(ALSHEMMARI; RAJAN; EMADI, 2016a; CAMPREGHER, 2011).

As mutações JAK2 incluem a V617F, encontrada em 95-97% dos pacientes com PV e em 50-65% daqueles com TE ou MFP. Os doentes expressam um fenótipo de: idade superior, hematócrito e contagem leucocitária mais elevada e menor contagem plaquetária (GRINFELD; NANGALIA; GREEN, 2017; PASSAMONTI; MORA; MAFFIOLI, 2016).

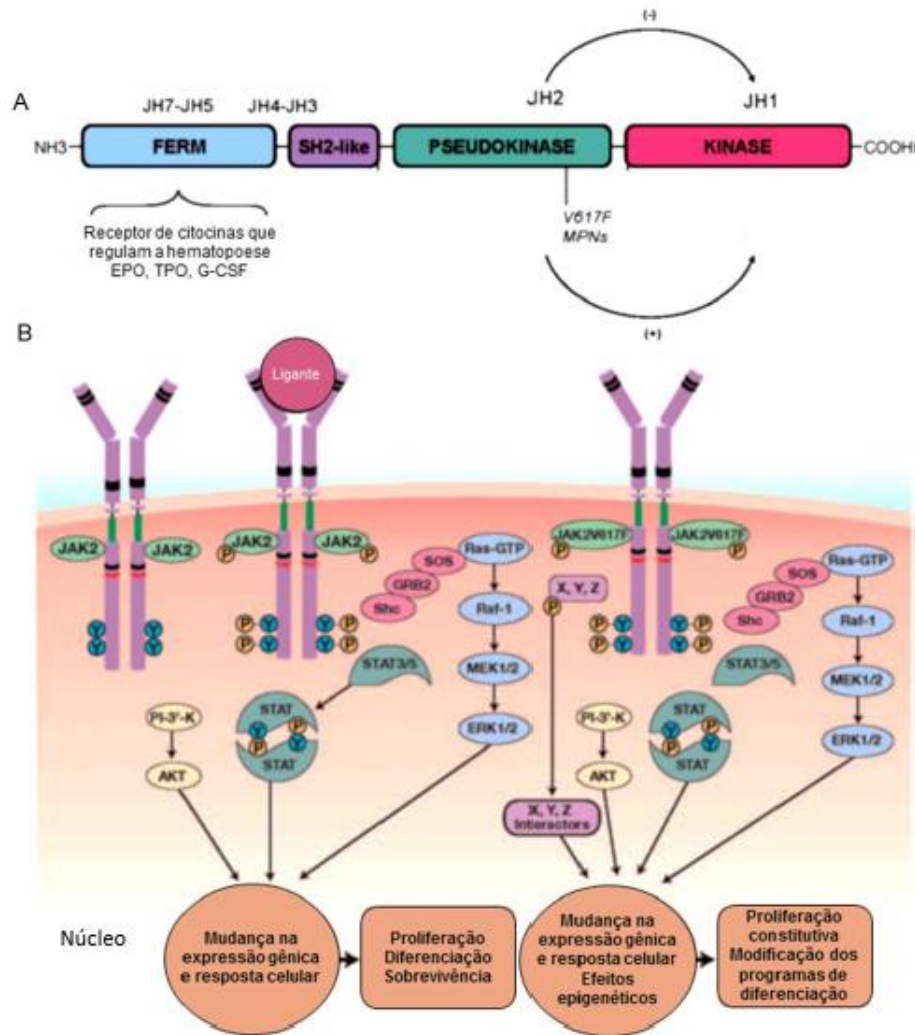
A recombinação mitótica que origina homozigose para a JAK2 V617F é frequentemente observada na PV e MFP, mas não na TE, sendo que na PV se associa a maior incidência de esplenomegalia, maior necessidade de citorredução, prurido e transformação fibrótica (KIM et al., 2015).

Na TE associa-se a um risco superior de trombose arterial e menor risco de evolução para mielofibrose (MF) (LIMSUWANACHOT et al., 2017; TEFFERI, 2013). No entanto, esta mutação não foi consistentemente associada à alteração da sobrevida global ou a transformação leucêmica na PV, TE ou MFP (CHEN; MULLALLY, 2011).

A JAK2 V617F não é exclusiva das NMP BCR-ABL negativas, podendo estar presente noutras neoplasias mielóides, como síndromes mielodisplásicas e leucemia mielóide aguda, no entanto, não está presente em linfomas ou tumores sólidos (LIMSUWANACHOT et al., 2017).

Outras mutações da JAK2 são menos comuns (até 5%), sendo agrupadas no exón 12. Estas são restritas a pacientes com PV, associando-se a eritrocitose isolada, nível sérico de eritropoetina subnormal, idade inferior ao diagnóstico e prognóstico semelhante ao da JAK2V617F. Os 50% dos pacientes com TE ou MFP que não possuem mutações na JAK2, constituem um subgrupo que difere na apresentação clínica e no prognóstico (LIMSUWANACHOT et al., 2017; LUNDBERG et al., 2014a).

Figura 1- Fisiopatologia da JAK2 nas NMPC.



A) Estrutura sequencial da proteína JAK2, em que se nota a proximidade entre os domínios JH1 e JH2. Fisiologicamente, o domínio pseudoquinase (JH2) exerce controle negativo sob o domínio catalítico JH1. A mutação V617F causa um dano que impede JH2 exercer sua função. O domínio “FERM” é a região responsável pela ligação dos fatores que regulam a hematopoiese, aqui listados como Eritropoetina (EPO), Trombopoetina (TPO) e Fator Estimulante de Colônias Granulocíticas (G-CSF). A sinalização constitutiva da JAK2, mediada pela mutação V617F, torna, portanto, a célula independente destes fatores de crescimento. As mutações no éxon 12 também comprometem a função do domínio JH2. **B)** Cascata de sinalização regulada pela ativação da JAK2. Sumariamente, a ativação da sinalização pelo ligante, deflagra sinais de proliferação via proteínas STATs. A vantagem proliferativa conferida pela JAK2V617F é o paradigma para compreensão da patogênese das NMPC Ph-negativo, uma vez que justifica a proliferação celular descontrolada e a inibição de sinais pró-apoptóticos. Fonte: Modificado de Vainchenker & Constantinescu, 2012.

2.2.2 Influência alélica da mutação *JAK2V617F*

A ocorrência da mutação em uma célula hematopoiética resulta na sua expansão clonal e consequentemente em uma progênie de células que são heterozigóticas para *JAK2V617F*. As células heterozigóticas possuem uma vantagem proliferativa em relação às células com *JAK2* selvagem. A recombinação mitótica entre as regiões homólogas do cromossomo 9p, entre o *locus* *JAK2* e o centrômero, causa então a perda da heterozigose. Uma das células filhas desta recombinação é homozigótica para a mutação e estabelece vantagem seletiva adicional sobre as células heterozigóticas e as células homozigóticas de *JAK2* selvagem, dominando completamente a hematopoese (KLAMPFL et al., 2013; KRALOVICS et al., 2005; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017b).

A homozigose na PV e na ET está associada com um estímulo da eritropoiese e mielopoiese, maior incidência de esplenomegalia, maior tamanho do baço e maior proporção de pacientes que necessitam de terapia citorrredutora (VANNUCCHI; HARRISON, 2017). Diferenças nas respostas de EPO e TPO ocorrem entre *JAK2V617F* homozigotos e heterozigotos (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017a).

Uma questão ainda não esclarecida é como uma única mutação pode ter pelo menos três doenças diferentes. Dados clínicos, biológicos e patológicos levantam uma das hipóteses: a dosagem gênica que postula uma correlação entre o fenótipo da doença e a proporção de alelos mutantes de *JAK2V617F* introduzindo o conceito de carga alélica, isto é, a razão entre o alelo mutante pelo total de alelos nas células hematopoiéticas (GRINFELD; NANGALIA; GREEN, 2017; NANGALIA; GREEN, 2017).

A carga alélica do *JAK2V617F* tem sido associada a certos fenótipos clínicos, tais como, uma maior incidência de prurido e esplenomegalia e um risco aumentado de trombose em doentes com PV e TE, embora a associação exata entre carga alélica e o resultado em longo prazo, permaneça controversa particularmente em pacientes com MF (GRINFELD; NANGALIA; GREEN, 2017).

Existe um consenso de que a presença de elevada carga alélica na PV, onde há uma ativação mais forte das vias de sinalização intracelular, associada com marcadores hematológicos e clínicos definidos, são indicativos de um fenótipo mais

agressivo. Por outro lado, uma baixa carga alélica na MF está associada à redução da sobrevida (GRINFELD; NANGALIA; GREEN, 2017; LUNDBERG et al., 2014a).

2.2.3 Mutação no gene CALR

A segunda alteração genética mais frequente consiste na mutação da calreticulina (CALR) no éxon9, que codifica uma chaperona ligada ao cálcio associada ao retículo endoplasmático (RE). Sua proteína possui três domínios com diferentes propriedades funcionais e estruturais: I- o domínio N-terminal, capaz de ligar lectinas e possui uma sequência de endereçamento da proteína ao RE; II- é uma região de conexão rica em prolina (domínio-P); III- trata-se da região C-terminal, que por seu caráter ácido, tem afinidade aumentada ao Ca^{++} . Ademais, no terceiro domínio da proteína, há uma sequência conservada chamada KDEL, responsável pela localização da Calreticulina no RE (GRINFELD et al., 2018b; GUGLIELMELLI et al., 2014).

A calreticulina também está associada a via JAK-STAT porém o mecanismo envolvido não é bem conhecido. Sabe-se que a mutação em CALR pode levar a sinalização independente de TPO devido a ligação de MPL na porção C-terminal da proteína mutada (GRINFELD; NANGALIA; GREEN, 2017)

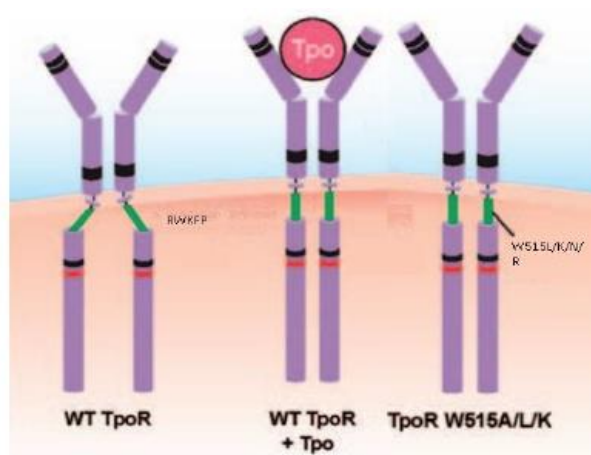
Esta mutação se encontra em 15 a 25% dos pacientes com TE e 25 a 35% dos casos de MF (BARBUI et al., 2017). Na TE associa-se a uma contagem plaquetária superior, hemoglobina e contagem leucocitárias inferiores do que na TE com mutação JAK2; ocorrendo geralmente em pacientes mais jovens e do sexo masculino (IMAI; ARAKI; KOMATSU, 2017). Na TE esta mutação associa-se a uma menor incidência de trombose e de eventos cardiovasculares e com uma maior taxa de transformação fibrótica. Na MF constitui um fator independente de melhor sobrevida global comparativamente aos outros subgrupos mutacionais (CHI et al., 2014; IMAI; ARAKI; KOMATSU, 2017; LIMSUWANACHOT et al., 2017).

2.2.4 Mutação no gene MPL

Em 3-10% dos pacientes com TE e MF pode estar presente a mutação MPL no éxon 10, que leva à ativação constitutiva do receptor da trombopoetina. Os doentes têm um fenótipo característico, com idade de aparecimento superior e um nível inferior de hemoglobina (JACQUES; SCHROYENS, 2015). Na TE, as mutações

MPL associam-se a uma contagem plaquetária superior, proliferação megacariocítica isolada, e eritropoetina sérica mais elevada comparada com a TE JAK2 V617F. No entanto, não foram demonstradas diferenças no prognóstico deste pequeno subgrupo, tanto nos pacientes com TE como naqueles com MF, comparativamente aos com mutação JAK2 (KIM et al., 2015; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017b).

Figura 2- Representação da fisiopatologia do receptor MPL nas NMP.



A ligação de trombopoetina (TPO) causa uma mudança conformacional no TPOR que através da JAK2 inicia os sinais de proliferação e diferenciação celular. Quando há mutação no éxon 10 do *MPL* há uma perda na capacidade de regulação da ativação do TPOR, que leva a ativação constitutiva via JAK2. Fonte: Modificado de Vainchenker, 2013

As mutações JAK2, MPL e CALR, são marcadores genéticos para a maioria dos casos (99% da PV, 85% da TE e MF), sendo ferramenta diagnóstica e prognóstica nas NMP, pois estes subtipos genéticos possuem diferenças significativas em relação ao curso clínico, progressão da doença e sobrevivência (LEE et al., 2009; MCPHERSON; MCMULLIN; MILLS, 2017).

Os pacientes “triplos negativos” (não apresentam mutações em nenhum dos 3 genes supracitados) representam cerca de 10-15% dos pacientes com TE e MFP e têm pior prognóstico associado a um risco particularmente elevado de transformação leucêmica (IMAI; ARAKI; KOMATSU, 2017; KIM et al., 2015).

Existem outras alterações, em genes envolvidos na metilação do DNA (TET2, DNMT3A e IDH1/2), na estrutura de cromatina (EZH2, ASXL1) e na reparação do DNA (TP53). As mutações nos reguladores epigenéticos são frequentemente

encontradas em pacientes com mutação da JAK2, ou MPL ou CALR, indicando uma cooperação entre estas duas classes de mutações na patogênese das NMP(ALSHEMMARI; RAJAN; EMADI, 2016b; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017b)

2.3 POLICITEMIA VERA (PV)

O termo policitemia é uma tradução literal do grego, "muitas células no sangue" que é caracterizada por um aumento da produção de células vermelhas independente do mecanismo que normalmente regula a eritropoese (CHI et al., 2014).

A descoberta da mutação *JAK2V617F* teve um grande impacto na abordagem diagnóstica da PV. Praticamente quase todos os pacientes com PV (aproximadamente 95%) carregam a mutação somática do gene JAK2 que resulta em proliferação não só da linhagem eritróide, mas de granulócitos e megacariócitos (PASQUIER et al., 2014; TEFFERI, 2013).

Outra mutação, localizada no éxon12 do gene JAK2, é funcionalmente similar a *JAK2V617F*, porém em menor ocorre em menor frequência (2-5% dos indivíduos com PV *JAK2V617F*-negativos). Em muitos casos, esses pacientes não apresentam proliferação de células da linhagem granulocítica ou megacariocítica, geralmente observadas em pacientes com PV clássica *JAK2V617F* positiva (LUNDBERG et al., 2014b).

O curso clínico da PV é caracterizado por uma elevada incidência de complicações trombóticas (arterial e venosa), devido a hiperviscosidade causada pela massa eritrocitária, isquemia, doença de Von Willebrand adquirida, mielofibrose pós-PV e leucemia aguda, que são as causas de mortalidade (SPIVAK, 2017).

Três fases da PV podem ser reconhecidas: (1) fase inicial, pré-policitêmica, caracteriza-se por leve eritrocitose; (2) fase policitêmica evidente, associado a um aumento significativo da massa eritrocitária; (3) fase pós-policitêmica, caracterizada pela "exaustão" da medula óssea, a chamada mielofibrose pós-PV, no qual citopenias são associadas a uma hematopoese ineficaz, fibrose medular, hematopoese extramedular e hiperesplenismo (CHAUFFAILLE, 2010).

A média de idade ao diagnóstico é de 60 anos, e pacientes jovens abaixo dos 20 anos são raros. É considerada uma doença indolente, com uma sobrevida média de aproximadamente, 14 anos e em pacientes mais jovens, 24 anos (TEFFERI et al, 2013).

O diagnóstico de PV requer integrações clínicas, laboratoriais e características histológicas da medula óssea. Em 2016, a OMS definiu novos critérios de diagnóstico para a PV, pois na publicação oficial da organização de 2008, a PV possivelmente era sub diagnosticada utilizando os níveis de hemoglobina definidos. Atualmente para o diagnóstico de PV, deve atender a todos os três critérios maiores ou dois maiores e o menor, conforme tabela 2.

Tabela 2-Critérios diagnósticos de Policitemia Vera de acordo com a OMS 2016.

Critérios Maiores	1-Hemoglobina >16,5 (homens);> 16 (mulheres ou hematócrito > 49% (homens), >48% (mulheres). 2- Biópsia da medula óssea: Proliferação das três linhagens com megacariócitos maduros. 3- Presença da mutação JAK2.
Critérios Menores	1-Eritropoetina sérica(EPO) subnormal

Fonte: adaptado WHO, 2016.

Os fatores de risco para a sobrevivência incluem: idade avançada, leucocitose episódio prévio de trombose. As taxas de transformação leucêmica em 20 anos são estimadas em menos que 10%, e a de transformação fibrótica são ligeiramente mais elevadas (14%)(TEFFERI; PARDANANI, 2016).

2.4 TROMBOCITEMIA ESSENCIAL

A trombocitemia essencial (TE) é a neoplasia mieloproliferativa crônica que envolve principalmente a linhagem megacariocítica.. É caracterizada pela trombocitose isolada persistente ($> 450 \times 10^9/L$ em sangue periférico) causada por mutação JAK2V617F, CALR ou MPL (SPIVAK, 2017), aumento do número e do tamanho dos megacariócitos maduros na medula óssea e clinicamente apresenta episódios de trombose e/ou hemorragia (LUNDBERG et al., 2014a).

A sobrevida média dos pacientes com TE é de 20 anos, refletindo a natureza mais indolente desta entidade (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

As características típicas da TE são complicações trombóticas e hemorrágicas, embora a maioria dos pacientes seja assintomática. Acometimentos isquêmicos transitórios e síndrome de Budd-Chiari são complicações que podem

ocorrer em pacientes com TE ou, antes do diagnóstico estabelecido. O número de plaquetas extremamente elevado proteolisa o fator de Von Willebrand, causando complicações hemorrágicas pela aquisição da doença de Von Willebrand. Alguns pacientes podem desenvolver mielofibrose (10%) conhecida como mielofibrose pós-TE e apenas cerca de 2% têm o risco de progredir para leucemia mielóide aguda (LMA) (KOOPMANS; VAN MARION; SCHOUTEN, 2012).

O diagnóstico de TE deve atender a todos os quatro critérios maiores ou os três primeiros maiores e um menor, definidos pela OMS, conforme Tabela 3 (ARBER et al., 2016). Por não haver um marcador específico genético ou biológico, outras causas de trombocitose devem ser excluídas, incluindo outras NMP, doenças inflamatórias e infecciosas, hemorragias e outros tipos de neoplasias hematológicas e não hematológicas. A presença do gene de fusão *BCR-ABL* exclui o diagnóstico de TE (ARBER et al., 2016; CHAUFFAILLE, 2010; CHEN; MULLALLY, 2011).

Tabela 3- Critérios diagnósticos para Trombocitemia essencial, de acordo com OMS 2016.

Critérios Maiores	1-Contagem de plaquetas $>450 \text{ mm}^3$ 2- Biópsia de medula óssea: proliferação megacariocítica, com maturação e núcleos hiperlobulados. Fibrose reticulínica inferior ao grau 1. 3- Nenhum critério de outra NMP 4- Presença de mutação JAK ou CALR ou MPL.
Critérios Menores	1-Presença de um marcador clonal ou ausência de evidência de trombocitose reativa.

Fonte: adaptado deWHO, 2016.

Em um estudo de mais de 1000 pacientes com TE, identificou que a idade mais avançada, anemia e a ausência de *JAK2V617F* como fatores de risco para progressão fibrótica e história de trombose e extrema trombocitose (hiperplaquetose) como fatores de risco para transformação leucêmica (BARBUI et al., 2017).

2.5 MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

A menos comum e mais agressiva das NMP é pode ser causada pelas mutações *JAK2V617F*, no gene *CALR* ou *MPL* (SPIVAK, 2017).Doença clonal originada da transformação neoplásica da célula tronco hematopoética,

acompanhada de alterações reacionais intensas do estroma medular, com fibrose colagênica, osteoclerose e angiogênese (CHAUFFAILLE, 2010).

Na MF, a hiperproliferação de células mielóides e megacariocíticas na medula óssea (MO) estimula a proliferação de fibroblastos, formando colágeno e fibrose. A doença cursa com duas fases: pré-fibrótica, inicial, com medula óssea hipercelular que evolui até a quase substituição do tecido hematopoético por fibras reticulínicas, caracterizado a fase fibrótica (SAVONA et al., 2015a).

O processo pré-fibrótico cursa com mieloproliferação crônica e hiperplasia megacariocítica atípica, sendo esta, um achado morfológico importante para o reconhecimento deste estágio. Os megacariócitos, muitas vezes formam densos aglomerados de tamanho variável, que são frequentemente adjacentes aos sinus vasculares e aos trabéculos na medula (MOULARD et al., 2014).

Já na fase fibrótica, a biópsia da medula óssea demonstra clara fibrose reticulínica ou colagenosa, resultado de proliferação de fibroblastos não clonais e hiperatividade induzida pelos fatores de crescimento de forma anormal, liberados pelos megacariócitos clonais expandidos (MASCARENHAS et al., 2013; MOULARD et al., 2014). Pode haver hipercelularidade focal, mas frequentemente é normocelular ou hipocelular, com zonas de alternância de hematopoese ativa com regiões hipocelulares de tecido conjuntivo frouxo e/ou de gordura. Focos de células imaturas podem ser mais proeminentes, embora os mieloblastos representem menos de 10% das células na MO (LUNDBERG et al., 2014a).

A fibrose da medula óssea é a marca da MF, que contribui para o comprometimento da hematopoese, levando à anemia grave, esplenomegalia acentuada, hematopoese extramedular e sintomas constitucionais (TEFFERI; PARDANANI, 2015). Dentre as NMP, a MF é a que tem maior impacto na qualidade de vida do paciente e sobrevida média de 5 anos (BARBUI et al., 2011).

A doença tem curso progressivo, caracterizado por falência da medula óssea, falência orgânica devido à hematopoese extramedular e transformação para leucemia aguda (SPIVAK, 2017).

Embora a etiologia da MF seja desconhecida, fatores ambientais podem ser relevantes desde que a MF foi associada em um pequeno número de pacientes expostos à radiação e a agentes petroquímicos, como benzeno e tolueno (PASSAMONTI; MORA; MAFFIOLI, 2016).

O hemograma na MF se caracteriza por um quadro leuco-eritroblástico (eritroblastos em circulação) com hemácias em forma de lágrima ou gota associada com uma MO hipocelular. Há leucopenia ou leucocitose e trombocitopenia ou trombocitose (MASCARENHAS et al., 2013; PASSAMONTI; MORA; MAFFIOLI, 2016).

O diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas, anormalidades laboratoriais, características do esfregaço do sangue periférico, morfologia da MO e em características moleculares e citogenéticas (BARBUI et al., 2017; TAM et al., 2017).

Segundo a OMS de 2016 o diagnóstico da MF fase pré-fibrótica requer todos os três maiores critérios e pelo menos um critério menor, conforme Tabela 4.

Tabela 4- Critérios diagnósticos de Mielofibrose (fase pré-fibrótica) de acordo com a OMS 2016.

Critério maior	1- Biopsia de medula óssea: Proliferação megacariocítica com atipia e grau 1 de fibrose reticulínica. Aumento da celularidade granulocítica e diminuição da eritropoética. 2- Nenhum critério de outra NMP 3- Presença da mutação JAK2ou CALR ou MPL; ou presença de outro marcador clonal ou ainda ausência de causas reativas de fibrose medular.
Critérios menores	1-leucoeritroblastose 2- Anemia 3-Esplenomegalia palpável 4-Aumento do nível sérico de LDH

Fonte: adaptado de Arber et al, 2016.

Para a MF evidente os critérios diagnósticos requerem todos os três critérios maiores e pelo menos dois critérios menores, conforme Tabela 5.

Tabela 5- Critérios diagnósticos da mielofibrose (fase fibrótica) de acordo com a OMS 2016.

Critério maior	1- Biopsia de medula óssea: Proliferação megacariocítica com atipia e grau 2 de fibrose reticulínica. 2- Nenhum critério de outra NMP 3- Presença da mutação JAK2ou CALR ou MPL; ou presença de outro marcador clonal ou ainda ausência de causas reativas de fibrose medular.
Critérios menores	1-leucoeritroblastose 2- Anemia 3- Esplenomegalia palpável 4- Aumento do nível sérico de LDH 5- Leucocitose $>11 \times 10^9 /L$

Fonte: adaptado de WHO, 2016.

As consequências e complicações clínicas associadas à MF frequentemente resultam na morte prematura por infecção, eventos trombóticos e hemorrágicos, falência cardíaca ou pulmonar e transformação leucêmica(SAVONA et al., 2015a; VANNUCCHI; HARRISON, 2017).

São considerados Fatores de risco pelo DIPSS (*Dynamic International Prognostic Scoring System*): idade acima dos 65 anos, níveis de hemoglobina menores que 10,0 g/dL, leucocitose acima de 25.000 ml/mm^3 , presença de sintomas constitucionais, plaquetas abaixo de $100 \times 10^9/L$, necessidade de transfusão de hemácias, número de blastos em sangue periférico menor que 1% e cariótipo anormal(RUMI; CAZZOLA, 2017; TEFFERI, 2014)

2.6 METALOPROTEINASES DE MATRIZ: FISIOLOGIA E CARCINOGENESE

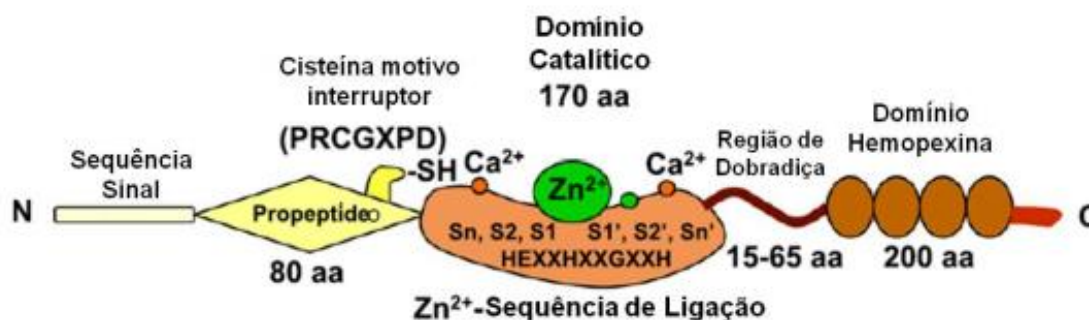
As metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas proteolíticas zinco dependentes capazes de degradar quase todos os elementos que compõem a matriz extracelular (MEC). Além das funções no remodelamento do espaço intersticial, as MMP desempenham outros papéis fundamentais na manutenção da homeostasia, ao atuar na embriogênese, cicatrização, angiogênese e contribuir para a proliferação e diferenciação celular(YADAV et al., 2014).

As MMP degradam seletivamente os vários componentes da MEC, resultando na liberação/ativação de fatores de crescimento latentes, citocinas e na clivagem de proteínas de superfície celular como receptores moleculares. (BAUVOIS, 2012a).

São conhecidos até o momento 24 tipos de MMP diferentes, e que são divididas em seis grupos de acordo com seu substrato específico: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3 e MMP-10), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), MMP tipo membrana (MT-MMP-14, MT-MMP-15, MT-MMP-16, MT-MMP-17, MT-MMP-24 e MT-MMP-25) e o grupo das outras MMP (YADAV et al., 2014).

Estruturalmente as MMP são proteínas multidomínio com uma composição baseada em uma sequência de um pró-peptídeo, um domínio catalítico zinco (Zn^{2+}) dependente, uma região de dobradiça ligante de peptídeo e um domínio de hemopexina. Adicionalmente, as MMP contêm um pró-domínio cisteína interruptor, cujo grupo sulfidril age como quelante do sítio ativo de ligação ao Zn^{2+} , mantendo desta maneira as MMP na sua forma de zimógeno não ativo (pró-MMP) (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; LIMA, 2016).

Figura 3- Imagem representativa da estrutura molecular geral da metaloproteinases.



Fonte: Maccoll; Khalil, 2015.

Essas proteases são expressas no seu estado inativo. Para a bioatividade dessas enzimas é necessário a remoção enzimática do grupo cisteína-sulfidril ligado ao sítio catalítico Zn^{2+} dependente (MACCOLL; KHALIL, 2015; ZHANG et al., 1999). A maioria das ativações das MMP é feita no ambiente extracelular por outras MMP, com exceção das MT-MMP que têm sua ativação no meio intracelular por serinas

proteases ou furinas convertases (NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2016; YADAV et al., 2014).

O amplo nicho de atividades desenvolvidas pelas MMP requer um sistema de regulação refinado e coordenado por diferentes esferas de controle, já que níveis desregulados das metaloproteínas podem representar um risco elevado à constância da homeostasia. Os pontos de controle são: a regulação da expressão gênica (incluindo modificações epigenéticas), a localização celular e tissular de liberação da MMP (compartimentalização), ativação da pró-enzima por remoção enzimática do pró-domínio, por estresse oxidativo ou fosforilação, e inibição por inibidores teciduais de metaloproteinase de matriz, os TIMP (ECKHARD et al., 2016; LIMA, 2016)

Os controles na expressão gênica podem atuar a nível de regulação transcricionais e pós transcricionais, ao modular os níveis de mRNA por meio de citocinas e miRNA. Como no caso do uso da IL-10 no tratamento de osteoartrite, ao aumentar os níveis de expressão do mRNA de MMP-13, bem como ao elevar os níveis de expressão proteica da MMP. Em contrapartida, níveis dos miRNA-411 e miRNAa-222 estão associados a baixos níveis de expressão das MMP em patologias que envolvem as MMP de natureza inflamatória (LIU et al., 2015).

No cerne da epigenética, alterações do balanço MMP/TIMP (inibidores tecido-específicos das metaloproteinases) por modificações nos níveis de DNA metiltransferases (DNMTs), enzima responsável por metilar uma citosina em citosina-fosfato-guanosina (CpG) e provocar, dessa maneira, um silenciamento da expressão gênica (EGEBLAD; WERB, 2002; LIU et al., 2015).

Em especial, a diminuição da atividade da DNMT1, por conseguinte a redução da hipermetilação do DNA permite o restabelecimento do equilíbrio da atividade entre as metaloproteinases e seus inibidores (TIMP) na diminuição da fibrose renovascular, nos casos de doenças renais crônicas (LIMA, 2016; NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2016).

A atividade das MMP é estreitamente regulada por inibidores endógenos em fluidos (α -macroglobulina e trombospondina-2) e os inibidores tecido-específicos das metaloproteinases (TIMP)(NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2016).

A α -macroglobulina é um inibidor de amplo espectro que se concentra nos fluidos teciduais e sangue. Que ao ligar-se a MMP forma um complexo com os receptores “scavengers” na superfície celular, que posteriormente é endocitado e

degradado intracelularmente (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; EGEBLAD; WERB, 2002).

A atuação da α -macroglobulina tem sido associada à atenuação da progressão da osteoartrite, pelo aumento de sua concentração no líquido sinovial e cartilagem afetados. A trombospondina-2 utiliza o mesmo mecanismo de inibição supracitado, mas atuando na inibição das MMP-2 e MMP-9 (BAUVOIS, 2012b; LIU et al., 2015).

Os inibidores teciduais compreendem quatro membros, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, com alta homologia estrutural e que atuam antagonicamente as MMP, ao formar uma ligação específica e quase sempre irreversível com essas proteases (EGEBLAD; WERB, 2002; NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2016). O aumento desses inibidores, ou, a superexpressão dos mesmos, têm sido associados a patologias de natureza inflamatória como a um fator protetor e/ou procrastinador da progressão da doença (NAVRATILOVA; KOLEK; PETREK, 2015).

Os papéis das MMP no câncer começaram a ser discutidos a partir de achados experimentais em fases avançadas do câncer como agentes facilitadores de metástase. Isso devido à interação entre células malignas e MEC, com superexpressão das MMP e consequente degradação das junções intercelulares, dissolução da membrana basal e da matriz intersticial (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

No entanto, as ações das MMP não estão restritas apenas na invasão tumoral, mas também na contribuição do desenvolvimento e manutenção do microambiente tumoral, o que por sua vez, favorece o progresso das células para a malignidade. As atividades adicionais incluem: ativação de fatores de crescimento, supressão da apoptose nas células tumorais, interferência na quimiotaxia da imunidade do hospedeiro e angiogênese. Recentemente, foi demonstrado que metaloproteinases de matriz também exercem um importante papel na mobilização de células tronco hematopoéticas, pois clivam o ligante do receptor c-Kit, no sentido da proliferação e diferenciação celular (ECKHARD et al., 2016; KLEIN; SCHMAL; AICHER, 2015).

2.7 METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 NAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

As gelatinases são o foco de maior atenção na relação MMP e câncer, pois estão superexpressas em tumores malignos e associadas a agressividade do tumor e pior prognóstico (BAUVOIS, 2012a). A expressão desregulada das MMP foi descrita em neoplasias hematológicas, como a leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia mielóide crônica (LMC), Síndrome mielodisplásicas (SMD) e linfomas (CHAUDHARY et al., 2016b).

Foi demonstrado que, altas concentrações séricas de MMP-9 podem prever um pior desfecho clínico em pacientes com LLC, o que pode auxiliar, no prognóstico da doença e na necessidade de tratamentos mais agressivos (BUGGINS et al., 2011). A expressão aumentada de MMP-2 e MMP-9 foi encontrada em pacientes de LMA e SMD, em contraste com amostras de indivíduos saudáveis, que apresentavam uma pequena produção de MMP-2, sugerindo que as produções dessas enzimas influenciaram no comportamento das células hematopoéticas (TRAVAGLINO et al., 2008).

Em pacientes com LLA houve uma correlação positiva entre a expressão aumentada da MMP-2 e o aparecimento de infiltrados extra medulares, sugerindo que a expressão dessas metaloproteinases tem papel na infiltração de células leucêmicas em outros órgãos (CHAUDHARY et al., 2016b).

Além disso, dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram identificados nas regiões promotoras dos genes *MMP2* (-1306 C>T) e *MMP9* (-1562 C>T), que possuem elevado efeito promotor, promovendo o aumento da expressão desses genes (SAVASOGLU; ERDAL, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de polimorfismos de base única nos genes *MMP2* (rs243865) e *MMP9* (rs17576) com o fenótipo de pacientes acometidos com Neoplasias mieloproliferativas crônicas cromossomo Filadélfia negativo (Policitemia Vera, Trombocitemia essencial e Mielofibrose primária).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo;
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas nos genes *MMP2* (rs243865) e *MMP9* (rs17576);
- Investigar a associação dos polimorfismos rs243865 e rs17576 com as principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O estudo do tipo análise exploratória e foi realizado com amostras de 293 pacientes, de ambos os sexos, diagnosticados com neoplasia mieloproliferativa crônica (Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial ou Mielofibrose Primária) e acompanhados no ambulatório do hospital de hematologia da fundação HEMOPE (janeiro de 2010 a dezembro de 2018). Os critérios de exclusão empregados foram indisponibilidade de acesso aos prontuários ou pacientes com diagnósticos inconclusivos.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho é parte de um projeto maior que objetiva a caracterização molecular de pacientes com NMP, e teve sua aprovação pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do HEMOPE número do parecer 013/09 (apêndice B). Desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Informado (apêndice A).

4.3 MÉTODOS DE COLETA

Foram utilizadas amostras de sangue periférico ou aspirado de medula óssea dos pacientes de mielofibrose primária, trombocitemia essencial ou policitemia vera que forem encaminhadas, de rotina, para o serviço de biologia molecular do laboratório de Hematologia do centro de ciências biociências da UFPE.

Os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos através da análise dos prontuários dos mesmos no HEMOPE.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para a obtenção de DNA genômico, foram coletados 5mL de sangue venoso em tubos de coleta a vácuo, contendo EDTA como anticoagulante e a extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos presentes no sangue periférico

ou medula óssea pela técnica de fenol-clorofórmio modificada, como descrito posteriormente (DAVIS *et al.*1986).

As amostras de SP ou MO foram submetidas a lise dos eritrócitos com auxílio de uma solução hipotônica (NH_4Cl 0,144M e NH_4HCO_3 0,01M), seguido de centrifugação a 1.200rpm por 10 min. Após o descarte do sobrenadante, uma solução de lavagem (TKM1, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 10 μL de Triton X-100. Após homogeneização e centrifugação a 1.200rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, um precipitado de leucócitos. A este precipitado foi adicionado 400 μL da solução de lise de leucócitos (TKM2, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25 μL de SDS 10% e incubado à 55°C durante 45 minutos. Após esse período, 180 μL de NaCl 5M foram adicionados e a solução mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, esse material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante recuperado e transferido para um novo micro tubo. Em seguida, foi adicionando 400 μL de fenol tamponado e 400 μL da solução SEVAG, composta de 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico, seguido de homogeneização e centrifugação a 14.000rpm por 5 minutos.

Mais uma vez o SEVAG foi misturado ao sobrenadante para última separação, e o sobrenadante foi transferido para um novo micro tubo. Neste novo micro tubo, foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,2 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada estéril, quantificado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EUA).

4.5 ANÁLISES MOLECULARES DOS POLIMORFISMOS

Foram selecionados para este estudo, com auxílio do software SNP Browser versão 4.0 os polimorfismos *MMP2* rs243865 (C>T) e *MMP9* rs17576 (A>G). Os critérios para seleção foram que os polimorfismos apresentassem MAF (do inglês, minor allele frequency) superiora 10% nas populações caucasianas e africanas, as quais contribuíram para a formação étnica de nosso país e que não estivessem localizados na região intrônica. Informações complementares foram adquiridas em bancos de dados do estudo do genoma humano tais como: 1000 Genomas

[<http://www.1000genomes.org>] e dbSNP Short Genetic Variations [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>].

Para a realização das genotipagens foi empregada a técnica de PCR em tempo real através da discriminação alélica utilizando o sistema TaqMan®. O sistema TaqMan de detecção de polimorfismos consiste de sondas que possuem um marcador fluorescente na extremidade 5', capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Entretanto, na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por um receptor de sinal luminoso (quencher), presente na extremidade 3' da sonda. Dessa forma, o sistema óptico do equipamento só é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação, mas, durante a amplificação, quando a sonda que se hibridizou ao produto-alvo é clivada pela atividade da exonuclease da enzima Taq DNA polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do quencher que não mais será capaz de absorver a luz emitida. Assim, ocorrerá um aumento na intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação do alvo. A principal vantagem deste método, é a hibridização da sonda em regiões previamente desenhadas, com emissão de fluorescência, e geralmente são menos susceptíveis de obter resultados falsos positivos (Applied Biosystems, 2014).

Todas as sondas e primers que foram utilizados estão disponíveis como ensaio pronto e validados para o uso em pesquisa de caráter científico no site [<https://products.appliedbiosystems.com>], para o SNP no *MMP2* (rs243865) o ensaio segue a identificação de C__3225943_10 e para o *MMP9* (rs17576) o ensaio está identificado como C__11655963_10. Para realização desta técnica foi utilizado o aparelho Rotor Gene 6000TM (Corbett Research, Austrália). As condições de reação foram estabelecidas de acordo com o protocolo recomendado pela empresa que comercializa as sondas (Life Technologies, Califórnia, USA). Todos estes procedimentos foram realizados utilizando-se a infraestrutura do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Para cada amostra, a reação foi preparada por 3,125µL de água, 0,625µL de primer/sonda, 6,25µL de máster mix 2,5µL de DNA; e a ciclagem para os ensaios foi 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR, foi definido o *threshold* para análise, plotando-se os

sinais de fluorescência para cada amostra e assim discriminando os alelos presentes, conforme recomendações do fabricante (LifeTechnologies, Califórnia, USA).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes foram apresentadas descritivamente. O teste de qui-quadrado foi empregado para comparar as diferenças entre as variáveis categóricas, aplicando-se o teste exato de Fisher quando o valor da variável foi inferior a 5. O teste “t” foi empregado para amostras não pareadas para comparar variáveis contínuas. Foram adotados como significativos os valores de nível de probabilidade (p) inferiores a 0,05 (5%). As análises foram realizadas utilizando o software SPSS Statistics 19.0.

5 RESULTADOS

Por meio da análise dos 293 prontuários dos pacientes acometidos com neoplasias mieloproliferativas crônicas, foram obtidas as principais características clínicas e laboratoriais desses indivíduos, descritas na Tabela 6.

Dentre 75 pacientes de PV, 52% (39) eram do sexo feminino e 48% (36) do sexo masculino. A idade mediana desses indivíduos foi de 66 anos variando de 21,6 a 81,6 anos. Nos pacientes com TE foi observado um predomínio dos casos em mulheres 74% (122), sendo a idade mediana de 54,3 anos (4,7-86,6). Entre os pacientes com MF também houve um ligeiro predomínio no sexo feminino 57,7% (30) diante de 42,3% (23) dos homens, com mediana de idade de 58,5 anos (25,8-91,5). Ocorreram apenas três óbitos entre os 293 pacientes analisados, sendo todos esses casos de policitemia vera.

Tabela 6- Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose incluídos no estudo.

Características	Policitemia vera (n = 75)		Trombocitemia essencial (n = 165)		Mielofibrose primária (n = 53)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sexo						
Mulher	39	52	122	74	30	57,7
Homem	36	48	43	26	23	42,3
Necessidade transfusional						
Sim	4	5,4	14	8,5	20	43,7
Não	71	94,6	151	91,5	33	56,3
Esplenomegalia						
Sim	28	33,3	18	10,9	41	77,3
Não	47	62,7	147	89,1	12	22,7
Trombose						
Sim	8	10,6	33	20	5	9,5
Não	67	89,4	132	80	48	90,5
Hemorragia						
Sim	14	18,7	16	8,7	7	13,2
Não	61	81,3	149	90,3	47	86,6
Prurido						
Sim	33	44	16	10,9	4	7,5
Não	42	56	149	89,1	49	92,5
Risco cardio vascular						
Sim	56	74,6	25	15,2	9	17
Não	18	25,4	140	84,8	44	83
Status Mutacional						
JAK2V617F	73	97,3	81	56,6	35	71

JAK2 éxon 12	2	2,7	-	-		
CALR	-	-	28	19,5	10	16
MPL	-	-	15	10,5	5	9
Triplo negativo	-	-	19	13,4	3	4
Hiperplaquetose						
Sim	1	1,3	71	43,1	14	26,4
Nao	74	98,7	94	56,9	39	73,6
Sintomas constitucionais						
Sim	48	64	49	29,7	24	45,3
Não	27	36	116	70,3	29	54,7
Idade (anos), mediana	66		54,3		58,5	
Intervalo	21,6- 86,1		4,7- 86,6		25,8- 95,1	
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	12,1		10,0		20,9	
Intervalo	4,2- 24,6		2,1- 48,4		2,6- 83,0	
Hematócrito (%), mediana	61,5		40,5		35,9	
Intervalo	44,1-79,0		17,8-50,1		16,4-39,8	
Hemoglobina (g/dL), mediana	19,8		13,2		11,4	
Intervalo	16,0-26,7		5,2-16,1		5,3-22,4	
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	526		906		516	
Intervalo	132-1440		465-2291		26-2125	

5.1 GENOTIPAGENS DOS GENES *MMP2* E *MMP9*

Foi possível realizar as genotipagens de todos os pacientes incluídos no estudo para os polimorfismos rs243865 e rs17576. As frequências genotípicas alélicas estão separadas por doença (PV, TE e MF) como apresentados nas tabelas 7,8 e 9.

Tabela 7- Frequências genotípicas e alélicas de pacientes com policitemia vera.

Polimorfismo	Genótipos	Frequências genotípicas	Alelos	Frequências alélicas
rs243865	CC	48 (64,0%)	C	119 (79,4%)
	CT	23 (30,6%)		
	TT	4 (5,4%)	T	31 (20,6%)
rs17576	AA	35 (46,7%)	A	100 (66,7%)
	AG	30 (40,0%,)		
	GG	10 (13,3%)	G	50 (33,3%)

Tabela 8-Frequencias genotípicas e alélicas de pacientes com trombocitemia essencial.

Polimorfismo	Genótipos	Frequências genotípicas	Alelos	Frequências alélicas
rs243865	CC	111 (67,3%)	C	272 (82,4%)
	CT	50 (30,3%)		
	TT	4 (2,4%)	T	58 (17,6%)

rs17576	AA	70 (43,2%)	A	214 (66,0%)
	AG	74 (45,5%)		
	GG	18 (11,1%)	G	110 (34,0%)

Tabela 9- Frequências genotípicas e alélicas de pacientes com mielofibrose primária.

Polimorfismo	Genótipos	Frequências genotípicas	Alelos	Frequências alélicas
rs243865	CC	30 (57,7%)	C	80 (76,9%)
	CT	20 (38,5%)		
	TT	2 (3,8%)	T	24 (23,1%)
rs17576	AA	19 (38,8%)	A	64 (65,3%)
	AG	26 (53,0%)		
	GG	4 (8,2%)	G	34 (34,7%)

5.2 ASSOCIAÇÕES DOS SNPS COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM PV, TE E MF.

Para o estudo de associação de ambos os polimorfismos, foram empregados os modelos de herança dominante, co-dominante, recessivo e sobredominante. Os resultados apresentados a seguir correspondem aos modelos que melhor refletiam à população em estudo.

Para o rs243865 (C>T), utilizando o modelo de associação dominante, onde o genótipo homozigoto selvagem (CC) é comparado *versus* o heterozigoto (CT) e homozigoto variante (TT), foi possível observar uma maior frequência de pacientes submetidos à sangria ($p=0,041$) e com maior risco cardiovascular ($p=0,034$) nos casos de policitemia vera. Em pacientes acometidos com trombocitemia essencial, para este mesmo modelo, foi observada associação com hiperplaquetose ($p=0,012$). Foi observada também uma tendência a trombose ($p=0,055$) em pacientes com mielofibrose. Nas tabelas 10, 11 e 12, estão compilados os resultados das análises referentes às genotipagens frente aos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com PV, TE e MF para o rs243865.

Tabela 10- Modelo dominante de herança genética para o polimorfismo rs243865 em pacientes com policitemia vera.

Características	Número de indivíduos		Homozigoto ancestral (CC)		Heterozigoto e homozigoto variante (CT+TT)		OR	p-valor
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		P<0,05

Sexo								
Feminino	39	52	23	58,9	16	41,1	0,97(0,58-1,57)	0,776
Masculino	36	48	25	69,4	11	30,5		
Idade, em anos, ao diagnóstico (mediana)	66		65,2		66,6		0,89(0,35-1,78)	0,267
intervalo	21,6 a 86,1		22,1-85,4		21,6-86,1			
Necessidade transfusional								
sim	4	5,4	3	75	1	25	0,91 (0,55-2,1)	0,591
não	71	94,6	45	63,4	26	36,6		
Esplenomegalia								
Sim	28	33,3	24	85,7	4	14,3	0,77 (0,42-1,18)	0,748
Não	47	62,7	24	51,	16	49,0		
Trombose								
Sim	8	10,6%	6	75	2	25	1,32 (0,72-1,92)	0,889
Não	67	89,4	40	59,7	27	40,3		
Hemorragia								
Sim	14	18,7	10	71,4	4	28,6	0,68 (0,32-1,42)	0,872
Não	61	81,3	38	62,3	23	37,7		
Fadiga								
Sim	18	24,0	13	72,2	5	27,8	0,39 (016-1,02)	0,618
Não	57	76,0	35	61,4	22	38,6		
Prurido								
Sim	33	44,0	22	66,6	11	33,4	1,08 (0,75-2,67)	0,349
Não	42	56,0	26	61,9	16	38,1		
Sangria								
Sim	60	80,0	35	58,3	25	41,7	1,04 (0,81-1,98)	0,041*
Não	15	20,0	13	86,6	2	13,4		
Risco cardiovascular								
Sim	56	74,6	32	57,1	24	42,9	0,95 (0,59-1,25)	0,034*
Não	19	25,4	16	84,2	3	15,8		
Mutações condutoras								
JAK2V617F	73	97,3	48	65,7	25	34,3		0,935
JAK2 éxon 12	2	2,7	2	100	0	0,0		0,885
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	12,1		12,8		13,1			0,760
Intervalo	4,2 a 24,6		4,2-23,8		4,5-24,6			
Hematócrito (%)	61,5		50,0		46,2			0,631
Intervalo	44,1 a 79		44,6-79		44,1-78,3			
Hemoglobina (g/dL)	19,8		19,9		19,5			0,693
Intervalo	16,0 a 26,7		16,2-26,2		16,0-26,7			
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	526 132 a		528		525			0,557

1440								
Intervalo	132 a 1440		138-1440		132-1423			
Tabela 11- Modelo dominante de herança genética para o polimorfismo rs24386 em pacientes com TE.								
Características	Número de indivíduos		Homozigoto ancestral (CC)		Heterozigoto e homozigoto variante (CT+TT)		OR	p-valor
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		P<0,05
Sexo								
Feminino	122	74	81	66,4	41	33,6	0,78 (0,34-1,91)	0,922
Masculino	43	26	30	69,7	13	30,3		
Idade, em anos, ao diagnóstico (mediana) intervalo	54,3		54,1		54,2			0,647
	4,7 a 86,6		4,7-85,2		22-86,6			
Necessidade transfusional								
Sim	14	8,5	8	57,1	6	42,9	0,56 (0,16-1,91)	0,35
Não	151	91,5	105	71,4	46	28,6		
Esplenomegalia								
Sim	18	10,9	11	61,1	7	38,9	1.07 (0,35-3,27)	0,895
Não	147	89,1	100	68,0	47	32,0		
Trombose								
Sim	33	20,0	11	33,3	22	66,7	1,37 (0,41-4,14)	0,600
Não	132	80,0	100	75,8	32	24,2		
Hemorragia								
Sim	16	8,7	9	56,5	7	43,5	0,86(0,39- 1,18)	0,541
Não	149	90,3	96	64,4	53	35,6		
Fadiga								
Sim	14	8,5	9	64,2	5	35,8	1,81 (0,72-2,27)	0,724
Não	151	91,5	99	65,5	52	34,5		
Prurido								
Sim	16	8,7	8	50	8	50	0,85 (0,33-2,2)	0,810
Não	149	89,1	93	62,4	60	37,6		
Sintomas contitucionais								
Sim	49	29,7	28	57,1	21	42,9	0,70 (0,37- 1,34)	0,324
Não	116	70,3	82	70,6	44	29,4		
Hiperplaquetose								
Sim	71	43,1	41	57	30	42,3	0,41	0,012*
Não	94	56,9	74	78,7	20	21,3		
Mutações								

condutoras							
JAK2	81	56,6	52	64,1	29	35,9	0,465
CALR	28	19,5	17	60,7	11	39,3	0,375
MPL	15	10,5	10	66,6	5	33,4	0,366
Triplos Negativos	19	13,4	14	73,7	5	26,3	0,218
Leucócitos (x10⁹/L)	10,0		10,0		10,1		0,457
Intervalo	2,1 a 48,4		2,1-42,3		3,4-48,4		
Hematócrito (%)	40,5		41,1		40,2		0,256
Intervalo	17,8 - 50,1		17,8-48,2		18,0-50,1		
Hemoglobina (g/dL)	13,2		13,0		13,2		0,634
Intervalo	5,2 a 16,1		5,2-15,3		6,1-16,1		
Plaquetas (x10⁹/L)	906		917		900		0,668
Intervalo	465 a 2291		478-2291		465-2245		

Tabela 12- Modelo dominante de herança genética para o polimorfismo rs243865 em pacientes com mielofibrose.

Características	Número de indivíduos		Homozigoto ancestral (CC)		Heterozigoto e homozigoto variante (CT+TT)		OR	p-valor
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		P<0,05
Sexo								
Feminino	30	57,7	18	60,	12	40,0	0,65 (0,41-1,78)	0,565
Masculino	23	42,3	12	52,1	11	47,9		
Idade, em anos, ao diagnóstico (mediana)	58,5		58,1		58,6			
intervalo	25,8 a 95,1		25,9-94,2		25,8-95,1			
Necessidade transfusional								
sim	20	43,7	11	55,0	9	45,0	0,45(0,31-1,09)	0,810
não	33	56,3	19	57,6	14	42,4		
Esplenomegalia								
Sim	41	77,3%	22	53,6	19	46,4	0,76 (0,61-1,91)	0,723
Não	12	22,7	8	66,6	4	33,4		
Trombose								
Sim	5	9,5	5	100	0	0	1,40 (0,67-1,62)	0,055
Não	48	90,5	25	52,0	23	48,0		
Hemorragia								
Sim	7	13,2	2	28,5	5	71,5	0,78(0,56-1,82)	0,549
Não	46	86,8	24	52,1	22	47,9		
Fadiga								
Sim	11	20,7	6	54,5	5	45,5	0,84(0,43-1,65)	0,446
Não	42	79,3	24	57,1	18	42,9		

Sintomas constitucionais								
Sim	24	45,3	13	54,1	11	45,9	0,76 (0,55-1,78)	0,882
Não	29	54,7	16	55,1	13	44,9		
Hiperplaquetose								
Sim	14	26,4	8	57,1	6	42,9	0,68 (0,37-1,53)	0,372
Não	39	73,6	22	56,4	16	43,6		
Mutações condutoras								
JAK2	35	71	19	54,2	16	45,8		0,347
CALR	10	16	6	60,0	4	40,0		0,366
MPL	5	9	2	40,0	3	60,0		0,531
Triplos Negativos	3	4	0	0	3	100		0,881
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	20,9		20,3		20,5			0,236
Intervalo	2,6 a 83,5		3,0-83,5		2,6-82,2			
Hematócrito (%)	35,9		35,4		35,7			0,319
Intervalo	16,4 a 49,8		16,4-48,0		17,2-49,8			
Hemoglobina (g/dL)	11,4		11,2		11,6			0,681
Intervalo	5,3 a 22,4		5,3-21,4		5,7-22,4			
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	516		518		516			0,553

Em relação ao polimorfismo rs17576 (A>G), utilizando o modelo co-dominante, houve associação com prurido (p=0,002) nos pacientes com PV e com a necessidade transfusional (p=0,019) nos pacientes com MF. Não houve associação deste polimorfismo com nenhuma característica clínica ou laboratorial nos casos de trombocitemia essencial. As tabelas 13,14 e 15 explicitam às análises genotípicas do rs17576 diante das características clínicas e laboratoriais dos pacientes de PV, TE e MF.

[illegible]

Sim	59	78,6	24	40,6	27	77,1	9	90	0,89 (0,54-1,76)	0,538
Não	16	21,4	6	37,5	8	22,9	1	10		
Risco cardiovascular										
Sim	56	74,6	24	42,8	26	74,3	7	70	0,54 (0,31-1,19)	0,886
Não	18	25,4	6	33,3	9	25,7	3	30		
Mutações condutoras										
JAK2V617F	73	97,3	26	35,6	33	94,2	10	100		0,541
JAK2 éxon 12	2	2,7	0	0	2	5,8	0	0		0,448
Leucócitos (x10⁹/L)		12,1		12		12		12,2		0,561
Intervalo		4,2 a 24,6		4,0-23,1		4,0-25,1		4,2-34,6		
Hematócrito (%)		61,5		62,2		61,5		61		0,378
Intervalo		44,1 a 79		42-79		44,1-79		44,1-76		
Hemoglobina (g/dL)		19,8		20,8		19,5		18,8		0,211
Intervalo		16,0 - 26,7		18,2-26,7		16-26,2		16-24,1		
Plaquetas (x10⁹/L)		526		522		526		529		0,564
Intervalo		132 - 1440		132-1431		132-1440		152-1440		

Tabela 14- Modelo codominante de herança genética para o polimorfismo rs17576 em pacientes com Trombocitemia Essencial.

Genótipos										
Características	Número de indivíduos		AA		AG		GG		OR	p-valor
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		P<0,05
Sexo										
Feminino	122	74	51	41,8	59	48,4	12	9,8	0,91 (0,44-1,32)	0,467
Masculino	43	26	19	44,2	18	41,9	6	13,9		
Necessidade transfusional										
Sim	14	8,5	11	78,5	3	21,5	0	0	0,57(0,32-1,86)	0,765
Não	151	91,5	59	39	74	49	18	12		
Esplenomegalia										
Sim	18	10,9	9	50	7	38,9	2	11,1	0,78 (0,45-1,10)	0,492
Não	147	89,1	61	41,5	70	47,6	16	10,9		
Trombose										
Sim	33	20	12	36,4	15	45,5	6	18,1	0,71 (0,44-1,87)	0,332
Não	132	80	61	46,2	59	44,7	12	9,1		
Hemorragia										
Sim	16	8,7	9	56,3	6	37,4	1	6,3	0,55(0,23-1,34)	0,791
Não	149	90,3	62	41,6	70	47	17	11,4		
Fadiga										
Sim	14	8,5	6	42,3	7	50	1	7,7	0,82(0,60-1,150)	0,476
Não	151	91,5	64	42,4	70	46,4	17	11,2		

Sintomas constitucionais										
Sim	49	29,7	25	51	19	38,8	5	10,2	0,67(0,43-1,95)	0,998
Não	116	70,3	45	38,8	58	50	13	11,2		
Hiperplaquetose										
Sim	71	43,1	29	40,8	31	43,7	11	15,5	0,82(0,39-1,44)	0,175
Não	94	56	41	43,6	46	48,9	7	7,5		
Mutações condutoras*										
JAK2	81	56,6	47	58	25	30,8	9	11,2		0,463
CALR	28	19,5	10	35,7	14	50	4	14,3		0,475
MPL	15	10,5	4	26,6	10	66,6	1	6,8		0,634
Triplos Negativos	19	13,4	9	47,3	10	52,7	0	0		0,449
Leucócitos (x10⁹/L)	10		9,7				10,1		0,623	
Intervalo	2,1-48,8		2,1 - 45,2		4,0-38,3		3,1 - 48,4			
Hematócrito (%)	40,5		39,9		38,1		40,2		0,297	
Intervalo	17,8 - 50,1		17,8-45,9		17,5-47,7		18- 50,1			
Hemoglobina (g/dL)	13,2		13,8		13		13,5		0,558	
Intervalo	5,2-16,1		5,8-16,1		5,6-15,8		5,2-15,6			
Plaquetas (x10⁹/L)	906		904		910		910		0,221	
Intervalo	465-2291		465-2268		474-2257		480-2291			

Tabela 15- Modelo codominante de herança genética para o polimorfismo rs17576 em pacientes com mielofibrose.

Características	Genótipos									p-valor
	Número de indivíduos		AG		AA		GG		OR	
	Nº	%	Nº	%			Nº	%		P<0,05
Sexo										
Feminino	30	57,7	17	56,6	9	42,8	4	100	0,92(0,65-1,49)	0,891
Masculino	23	42,3	9	39,1	14	57,8	0	0		
Necessidade transfusional										
sim	20	43,7	7	35	9	42,2	4	100	0,84 (0,54-2,1)	0,019
não	33	56,3	19	57,6	14	57,8	0	0		
Esplenomegalia										
Sim	41	77,3	20	48,7	18	63,1	0	0	0,76(0,38-1,12)	0,679
Não	12	22,7	7	58,3	5	36,6	4	100		
Trombose										
Sim	5	9,5	3	60	4	10,6	0	0	0,88(0,54-1,56)	0,887
Não	48	90,5	23	47,9	19	89,4	4	100		
Hemorragia										
Sim	7	13,2	2	28,5	3		1	25	0,90(0,67-1,76)	0,457
Não	46	86,8	21	45,6	20		3	75		
Fadiga										
Sim	11	20,7	5	45,4	13	52,6	3	75	0,49(0,31-1,94)	0,631
Não	42	79,3	21	50	10	47,4	1	25		
Sintomas contitucionais										
Sim	24	45,3	12	50	7	31,6	2	50	0,78(0,43-1,68)	0,778
Não	29	54,7	14	48,8	16	68,4	2	50		

Hiperplaquetose										
Sim	14	26,4	9	64,2	4	21,1	4	100	0,55(0,39-2,1)	0,326
Não	39	73,6	19	48,7	19	78,9	0	0		
Mutações condutoras										
JAK2	35	71	16	45,7	14	63,1	2	50		0,541
CALR	10	16	4	40	4	21,5	1	25		0,522
MPL	5	9	3	60	1	5,2	1	25		0,671
Triplos Negativos	3	4	1	33,3	2	10,2	0	0		0,762
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	20,9		20,2		21		21,1			0,682
Intervalo	2,6 a 83,5		2,6-82		2,6-84,1		3,0-83,5			
Hematócrito (%)	35,9		35,4		35,8		36,1			0,551
Intervalo	16,4 - 49,8		16,1-47,2				17,3-49,8			
Hemoglobina (g/dL)	11,4		11		11,4		11,6			0,722
Intervalo	5,3 - 22,4		5,3-20,6		5,0-21,7		6,0-22,4			
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	516		512		515		518			0,883
Intervalo	26-2125		26-2056		26-2034		30-2125			

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas as características clínicas, laboratoriais e moleculares de 293 pacientes acometidos com neoplasias mieloproliferativas crônicas (PV, TE e MF), tal como suas associações com os polimorfismos rs243865 (C>T) e rs17576 (A>G) nos genes *MMP2* e *MMP9*, respectivamente.

Embora nossa coorte fosse composta principalmente por pacientes com TE (57%), estes dados estão em consonância com o estipulado epidemiologicamente para as NMP Ph-negativo, em que a frequência de MF (0,4 casos/100.000 habitantes) é marcadamente menor que a de PV e TE (2,0 casos/100.000 habitantes) (Tefferi& Vardiman 2008; Kiladjian 2012; Tefferi 2014; Tefferi 2015). Além disso, houve um predomínio de pacientes do sexo feminino nas três entidades, especialmente em TE. Com relação à idade ao diagnóstico, o grupo de pacientes se apresentou ligeiramente mais jovem nos casos de TE e de MF com 54,3 e 58,5 anos, respectivamente. Pacientes mais jovens geralmente possuem um curso clínico melhor, com menos complicações e melhor sobrevida (KOOPMANS; VAN MARION; SCHOUTEN, 2012; NANGALIA; GREEN, 2017). Diferentemente, os casos de PV obtiveram uma mediana de 66 anos, o que corrobora a literatura, onde o pico do aparecimento das neoplasias mieloproliferativas ocorre na sexta década de vida (TEFFERI, 2013).

No que se refere aos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos neste trabalho, evidenciamos duas situações inerentes a este grupo de neoplasia hematológica. A primeira relaciona-se com as características clínicas das NMP, como a prevalência de sintomas constitucionais, eventos trombóticos e hemorrágicos. Embora esses achados possam sobrepor-se entre as entidades, algumas se destacam com maior frequência, por exemplo, a presença de sintomas constitucionais (cefaléia, prurido, tontura e sudorese) em PV, necessidade transfusional e esplenomegalia em MF e a hiperplaquetose em TE (KVASNICKA, 2013; SAVONA et al., 2015). De forma semelhante, observam-se nos achados laboratoriais, uma maior frequência de aumento da massa eritrocitária em PV, aumento do número de plaquetas em TE e aumento do número de leucócitos naqueles pacientes de MF (MOULARD et al., 2014; RUMI, 2016).

Com relação aos marcadores clonais, houve uma distribuição de frequência semelhante à literatura em cada doença analisada (ALSHEMMARI; RAJAN; EMADI,

2016a; PASSAMONTI; MORA; MAFFIOLI, 2016), com o predomínio da mutação JAK2V617F, que esteve presente em 97,3% casos de PV, 56,6% casos de TE e 71% de MF. A segunda mutação mais frequente foi a CALR com 19,5% em TE e 16% em MF, seguida pela mutação MPL que, por sua vez, esteve envolvida em 10,5% e 9% nos pacientes de TE e MF, respectivamente. Os casos triplo-negativos, nos quais os marcadores clonais não estão presentes, ocorreram em 13,4% dos casos de TE e 4% dos casos de MF. Segundo a literatura, esses pacientes possuem sobrevida menor do que aqueles que apresentam alguma mutação condutora (GRINFELD et al., 2018a; LUNDBERG et al., 2014a).

Em relação aos polimorfismos estudados, rs243865 (C>T) e rs17576 (A>G), os alelos selvagens foram mais frequentes e os alelos variantes ficaram próximos da frequência descrita pela base dados *Ensembl* para as populações relacionadas, sendo de até 25% para o alelo T e de até 46% para o alelo G. Com respeito às associações desses SNP com o fenótipo dos pacientes, foi observado que o genótipo ancestral (CC) do rs243865(C>T) esteve associado com maior frequência de sangria ($p=0,041$) e com risco cardiovascular ($p=0,034$) em pacientes com PV. Também houve associação deste genótipo (CC) com a hiperplaquetose ($p=0,012$) em pacientes com TE e uma tendência à trombose ($p=0,055$) em pacientes com MF.

Esses achados são importantes do ponto de vista clínico, pois diante do aumento da massa eritrocitária na PV, a sangria é um procedimento preventivo que, quando não realizado, implica diretamente na sobrevida desses pacientes, podendo chegar a apenas dois anos (RUMI; CAZZOLA, 2017; TEFFERI; BARBUI, 2017). O mesmo aumento de massa eritrocitária pode elevar o risco cardiovascular, acarretando em complicações como dores de cabeça, hipertensão, eritromelalgia (queixa comum entre os pacientes de PV) e até acidente vascular encefálico. Já a hiperplaquetose na TE é reconhecida como fator de risco à transformação leucêmica e sobrevida desses pacientes assim como o histórico de trombose em MF (TEFFERI; BARBUI, 2017).

O polimorfismo rs17576 (A>G) mostrou-se associado com menor frequência de prurido em pacientes com PV e com maior frequência de necessidade transfusional em pacientes acometidos com MF. O prurido na PV é um dos sintomas mais comuns e um dos primeiros a ser notado, geralmente após o banho (MEIER; BURTON, 2017). A necessidade de transfusão em pacientes com mielofibrose também é um fator de risco à transformação leucêmica e, consequentemente à

sobrevida (HARRISON et al., 2017; NANGALIA; GREEN, 2017; RUMI; CAZZOLA, 2017).

Em relação ao polimorfismo rs243865 (C>T), do gene *MMP2*, nas neoplasias mieloproliferativas, o estudo de Sag et al. (2015) não encontrou associações com as características de PV e TE, porém outro polimorfismo (rs2285053 C>T), também na região promotora do gene, mostrou-se associado com hipertensão nesses pacientes. Em outro estudo de Gouda et al. (2014) envolvendo linfomas não Hodgkin e, a presença do alelo “T” esteve associado com estádios clínicos avançados (tipo III e IV) em egípcios. Possivelmente, devido ao complexo mecanismo de expressão e regulação das metaloproteinases, os SNP também se comportem de forma bastante variada em cada tecido.

No que diz respeito ao polimorfismo rs17576 (A>G), no estudo de Maral et al. (2015) foram observadas diferenças estatisticamente significantes na frequência dos genótipos entre pacientes de PV e TE quando comparados ao grupo controle, sendo ainda maior a frequência alélica (G=63%) e genotípica (GG= 50%) nos casos de TE. Maral et al. (2015) também encontrou associação deste polimorfismo com pacientes JAK2V617F positivos e trombose em pacientes com TE, contudo sem associação com o número de plaquetas.

Os trabalhos de Sag et al. (2015) e Maral et al. (2015) pesquisaram as influências dos polimorfismos nos genes *MMP2* e *MMP9* apenas em pacientes de policitemia vera e trombocitemia essencial. No primeiro, foram analisados 46 pacientes de PV e 56 de TE. No segundo estudo, 28 pacientes eram de PV e 12 acometidos com TE. Não foram analisados pacientes com mielofibrose. A não reprodutibilidade das associações encontradas neste trabalho com os estudos anteriores pode estar relacionada às diferentes populações estudadas e ao N amostral.

O único grupo que estudou o possível papel dos níveis de expressão das metaloproteinases de matriz e seus inibidores na remodelação da medula óssea em pacientes com mielofibrose (JENSEN et al., 2003), encontrou uma relação desequilibrada entre o inibidor TIMP-1 e a MMP9 quando comparada com indivíduos saudáveis. Esse desequilíbrio do microambiente extracelular pode estar envolvido com aumento de depósito de componentes da matriz, influenciando no processo de fibrose (JENSEN et al., 2003). O polimorfismo rs17576 (A>G) leva a uma alteração estrutural da MMP9 que diminui a afinidade química da ligação da enzima ao

substrato que, por sua vez, pode acarretar em menor degradação do colágeno tipo IV e consequentemente sua acumulação. (ALLAN et al., 1995; SHIPLEY et al., 2002; ZHANG et al., 1999). Embora o presente trabalho não tenha avaliado os referidos polimorfismos do ponto de vista funcional, as referencias supracitadas sugerem que a associação encontrada deste polimorfismo no presente trabalho possa estar intimamente ligada com a necessidade transfusional dos pacientes de mielofibrose, já que a doença cursa com hematopoese ineficaz devido à progressiva substituição do tecido hematopoético por fibrose.

Recentemente, polimorfismos nas MMP 7 e 15 foram associadas com pior prognóstico em pacientes com leucemia mielóide aguda, demonstrando que as MMP possuem potencial como marcador e possível alvo terapêutico em malignidades hematológicas (WU et al., 2019). O presente estudo é o maior já realizado, em número de indivíduos, envolvendo polimorfismos dos genes *MMP2* e *MMP9* nas neoplasias mieloproliferativas crônicas até o momento. Devido aos poucos estudos envolvendo tais neoplasias, foram encontradas associações inéditas com achados relevantes que impactam no curso clínico e qualidade de vida desses pacientes. Atualmente não existe tratamento que alcance a cura nas neoplasias mieloproliferativas, exceto o transplante de medula óssea (RUMI, 2016; TEFFERI, 2016; TEFFERI; PARDANANI, 2015). Sendo assim, o manejo clínico desses pacientes concentra-se em tratamentos sintomáticos e intervenções terapêuticas baseadas nas classificações de risco de cada entidade a fim de evitar a progressão das mesmas.

Devido aos mecanismos complexos de regulação que os SNP podem sofrer e diante da variabilidade genética de cada população, mais estudos são necessários com o objetivo de esclarecer como os genes das metaloproteinases podem contribuir com as manifestações clínicas desses pacientes e servir como ferramenta prognóstica.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- As características clínicas e laboratoriais dos pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose, no estado de Pernambuco, estão em consonância com a literatura mundial.
- O polimorfismo do gene *MMP2* rs243865(C>T) esteve associado, em seu genótipo dominante, com maior frequência de sangria em pacientes de PV, com hiperplaquetose em pacientes de TE e ainda apresentou uma tendência à trombose em pacientes com MF.
- No modelo codominante, o genótipo AG do polimorfismo do gene *MMP9* rs17576(A>G) mostrou-se associado com prurido e necessidade de transfusão sanguínea em pacientes com PV e MF, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, J. A. et al. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. **Biochemical Journal**, v. 309, n. 1, p. 299–306, 1995.
- ALSHEMMARI, S. H.; RAJAN, R.; EMADI, A. Molecular Pathogenesis and Clinical Significance of Driver Mutations in Primary Myelofibrosis: A Review. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 6, p. 501–509, 2016a.
- ALSHEMMARI, S. H.; RAJAN, R.; EMADI, A. Molecular Pathogenesis and Clinical Significance of Driver Mutations in Primary Myelofibrosis: A Review. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 6, p. 501–509, 2016b.
- 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. 2391–2406, 2016.
- BARBUI, T. et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European leukemiaNet. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 6, p. 761–770, 2011.
- BARBUI, T. et al. Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms : Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. v. 29, n. 6, p. 761–770, 2017.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 1, p. 29–36, 2012a.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014.
- BUGGINS, A. G. S. et al. Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. **British Journal of Haematology**, v. 154, n. 2, p. 216–222, 2011.
- CAMPREGHER, P. V. Molecular biology of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. 2011.
- CHAUDHARY, A. K. et al. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: An overview. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 753, n. 1, p. 7–23, 2013.
- CHAUDHARY, A. K. et al. **Pleiotropic roles of metalloproteinases in hematological malignancies: An update** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2016a.
- CHAUDHARY, A. K. et al. Pleiotropic roles of metalloproteinases in hematological malignancies: An update. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 7, p. 3043–3051, 2016b.
- CHAUFFAILLE, M. DE L. L. F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 4, p. 308–316, 2010.
- CHEN, E.; MULLALLY, A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms ? **Hematology / the Education Program of the**

American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, n. 2, p. 268–276, 2011.

CHI, J. et al. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1152–4, 2014.

ECKHARD, U. et al. Active site specificity profiling datasets of matrix metalloproteinases (MMPs) 1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 and 14. **Data in brief**, v. 7, p. 299–310, 2016.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–174, 2002.

F, I. P. A.; F, K. K. Predictive factors of thrombosis for patients with essential thrombocythaemia : A single center study *. 2017.

GOUDA, H. M. et al. Association between matrix metalloproteinase 2 (MMP2) promoter polymorphisms and the susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma in Egyptians. **Annals of hematology**, v. 93, n. 8, p. 1313–1318, 2014.

GRINFELD, J. et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 15, 2018a.

GRINFELD, J. et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 15, p. 1416–1430, 11 out. 2018b.

GRINFELD, J.; NANGALIA, J.; GREEN, A. R. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. **Haematologica**, v. 102, n. 1, p. 7–17, 2017.

GUGLIELMELLI, P. et al. *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms: Hidden behind the reticulum: *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 5, p. n/a-n/a, 2014.

HARRISON, C. N. et al. The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: results from the international MPN Landmark survey. **Annals of Hematology**, v. 96, n. 10, p. 1653–1665, 2017.

HEMATOL, A. et al. Novel hematological parameters for the evaluation of patients with myeloproliferative neoplasms : the immature platelet and reticulocyte fractions. 2017.

HEMATOLOGY, I. et al. JAK2, MPL and CALR. v. 11, n. 1, p. 5–25, 2016.

IMAI, M.; ARAKI, M.; KOMATSU, N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **International Journal of Hematology**, n. i, p. 1–5, 2017.

JACQUES, J.; SCHROYENS, W. Changing Concepts of Diagnostic Criteria of Myeloproliferative Disorders and the Molecular Etiology and Classification of Myeloproliferative Neoplasms : From Dameshek 1950 to Vainchenker 2005 and Beyond. p. 36–51, 2015.

JENSEN, M. K. et al. Elevated plasma levels of TIMP-1 correlate with plasma suPAR/uPA in patients with chronic myeloproliferative disorders. **European Journal of Haematology**, v. 71, n. 5, p. 377–384, 2003.

KILADJIAN, J.-J. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology**.

American Society of Hematology. Education Program, v. 2012, p. 561–6, 2012.

KIM, S. Y. et al. CALR, JAK2, and MPL Mutation Profiles in Patients With Four Different Subtypes of Myeloproliferative Neoplasms. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 143, n. 5, p. 635–644, 2015.

KLAMPFL, T. et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2379–2390, 2013.

KLEIN, G.; SCHMAL, O.; AICHER, W. K. Matrix metalloproteinases in stem cell mobilization. **Matrix Biology**, v. 44–46, p. 175–183, 2015.

KOOPMANS, S. M.; VAN MARION, A. M. W.; SCHOUTEN, H. C. Myeloproliferative neoplasia: A review of clinical criteria and treatment. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 70, n. 4, p. 159–167, 2012.

KRALOVICS, R. et al. A Gain-of-Function Mutation of Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, p. 1779–1790, 2005.

KVASNICKA, H. M. WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 8, n. 4, p. 333–341, 2013.

LEE, T.-S. et al. Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13–15: comparison with V617F and exon 12 mutations. **BMC structural biology**, v. 9, p. 58, 2009.

LIMA, L. T. D. E. Expressão gênica de metaloproteinases e de seus reguladores em neoplasias mieloproliferativas : associação com biomarcadores de angiogênese e status mutacional Expressão gênica de metaloproteinases e de seus reguladores em neoplasias mieloproliferativas : 2016.

LIMSUWANACHOT, N. et al. Clinical and hematological relevance of JAK2 V617F and CALR mutations in BCR-ABL-negative ET patients. **Hematology**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2017.

LIU, W. et al. miR-221 and miR-222 Simultaneously Target RECK and Regulate Growth and Invasion of Gastric Cancer Cells. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 2718–2725, 2015.

LUNDBERG, P. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 123, n. 14, p. 2220–2228, 2014a.

LUNDBERG, P. et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 11, p. 2213–2230, 2014b.

MACCOLL, E.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 355, n. 3, p. 410–428, 2015.

MARAL, S. et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 polymorphism in patients with myeloproliferative diseases: a STROBE-compliant observational study. **Medicine**, v. 94, n. 16, p. 1–8, 2015.

MASCARENHAS, J. O. et al. Advances in myelofibrosis: A clinical case approach. **Haematologica**, v. 98, n. 10, p. 1499–1509, 2013.

MCPHERSON, S.; MCMULLIN, M. F.; MILLS, K. Epigenetics in Myeloproliferative

- Neoplasms. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. XX, n. X, p. 1–8, 2017.
- MEIER, B.; BURTON, J. H. Myeloproliferative Disorders. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 31, n. 6, p. 1029–1044, 2017.
- MOULARD, O. et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. **European Journal of Haematology**, v. 92, n. 4, p. 289–297, 2014.
- NANGALIA, J.; GREEN, A. R. Myeloproliferative neoplasms: From origins to outcomes. **Hematology**, 2017.
- NANGALIA, J.; GRINFELD, J.; GREEN, A. R. Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, n. 1, p. 101–126, 2016.
- NAVRATILOVA, Z.; KOLEK, V.; PETREK, M. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. 3, p. 177–193, 2016.
- PASQUIER, F. et al. Myeloproliferative Neoplasms: JAK2 Signaling Pathway as a Central Target for Therapy. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 14, n. September, p. S23–S35, 2014.
- PASSAMONTI, F.; MORA, B.; MAFFIOLI, M. New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms. p. 137–143, 2016.
- RUMI, E. Diagnosis , risk stratification , and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. 2016.
- RUMI, E.; CAZZOLA, M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 680–692, 2017.
- SAG, S. O. et al. MMP2 gene-735 C/T and MMP9 gene-1562 C/T polymorphisms in JAK2V617F positive myeloproliferative disorders. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 2, p. 443–449, 2015.
- SAVASOGLU, K.; ERDAL, M. E. Association of MMP-2 (-1306 C > T), MMP-9 (-1562 C > T) Gene Polymorphism and the Formation of the Hematological Malignancies. **Iranian Journal of Public Health**, v. 45, n. 3, p. 392–393, 2016.
- SAVONA, M. R. et al. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic / myeloproliferative neoplasms (MDS / MPN) in adults. **Blood**, v. 125, n. 12, p. 1857–1866, 2015a.
- SAVONA, M. R. et al. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. **Blood**, v. 125, n. 12, p. 1857–1865, 2015b.
- SHIPLEY, J. M. et al. The Structural Basis for the Elastolytic Activity of the 92-kDa and 72-kDa Gelatinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4335–4341, 2002.
- SKODA, R. C.; DUEK, A.; GRISOUDARD, J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Experimental Hematology**, v. 43, n. 8, p. 599–608, 2015.
- SPIVAK, J. L. Myeloproliferative Neoplasms. p. 2168–2181, 2017.
- TAM, C. S. et al. The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL χ myeloproliferative neoplasms. v. 112, n. 5, p. 1628–1638, 2017.
- TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative

neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 22, n. 1, p. 14–22, 2008.

TEFFERI, A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 6, p. 508–516, 2013.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 1, p. 97–108, 2014.

TEFFERI, A. CME Information: Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology J H**, v. 90, n. February, p. 162–173, 2015.

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

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

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative Neoplasms. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 1, p. 97, 2015.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative Neoplasms A Contemporary Review. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 1, p. 97–105, 2016.

TRAVAGLINO, E. et al. Biological and clinical relevance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes. **European Journal of Haematology**, v. 80, n. 3, p. 216–226, 2008.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. **Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms** **Blood**, 2017a.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 667–679, 2017b.

VANNUCCHI, A. M.; HARRISON, C. N. Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 693–703, 2017.

WU, Y. et al. The prognostic value of matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-15 in acute myeloid leukemia. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 6, p. 10613–10624, 2019.

YADAV, L. et al. Matrix metalloproteinases and cancer - Roles in threat and therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 3, p. 1085–1091, 2014.

ZHANG, B. et al. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. **Human Genetics**, v. 105, n. 5, p. 418–423, 1999.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
MAIORES DE 18 ANOS
(resolução 466/12)

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa "Associação dos polimorfismos *MMP2* e *MMP9* com características clínicas e laboratoriais em pacientes com Mieloproliferativas Crônicas ", que está sob a responsabilidade do pesquisador Fabio Rodrigo Barbosa Dutra Nascimento (Endereço: Rua 48, 12, nº 55, apto. 1602, Espinheiro, Recife, PE, CEP: 52050-380 – Fone: (81) 988612131 – E-mail: fabiodutra@live.com) e sob a orientação do professor Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo (81) 9908-9382 - (araujoarl@hotmail.com). Também participam também desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo (81) 9976-5136 - (aderson@hotlink.com.br), Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (81) 9800-8105 – (macbezerraufpe@gmail.com).

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o(a) Sr.(a) não será penalizado(a) de forma alguma. O(a) Sr.(a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

Nós verificamos que as Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas são doenças clonais com sintomas severos ao bem estar do paciente, podendo causar hipertensão arterial sistêmica, trombose e hemorragia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas nas Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas permitirá a detecção precoce e estratificação de risco destes pacientes. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, possa haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: ceppccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS MMP2 E MMP9 COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS EM PACIENTES COM MIELOPROLIFERATIVAS

APÊNDICE B- CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo "Associação dos polimorfismos *MMP2* e *MMP9* com características clínicas e laboratoriais em pacientes com Mieloproliferativas Crônicas ", como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data

Assinatura do participante



Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

	Comitê de Ética em Pesquisa Av. Joaquim Nabuco, 171 Graças Recife-PE CEP: 52011.000- Tel.: (81) 3182-4771 Correio-e: cep.hemope@gmail.com	
---	---	---

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL: Nº. 013/2009

Título do Projeto: Prevalência da Mutação JAK2 em Pacientes em Síndromes Mieloproliferativas Crônicas Atendidos na Fundação Hemope.

Instituição Solicitante: Faculdade Maurício de Nassau

Pesquisadora: Aderson da Silva Araújo

Identidade: 888.191SSP-PE **CPF:** 064.073.904-00 **Telefone:** 81 – 3182-4695

Finalidade: Conclusão do Curso de Bacharel em Biomedicina

Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia- Unilabe.

Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Orientado: Rafael Ramos da Silva

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Determinar a prevalência da mutação JAK2 V617F em pacientes com síndromes mieloproliferativas crônicas BCR/ABL negativas atendidos no Hospital de Hematologia e Hemoterapia da Fundação Hemope.

Objetivos Específicos: Padronizar no Laboratório na Unidade de Laboratórios Especializados da Fundação Hemope (UNILABE) a técnica descrita na literaturas para detecção da Mutação JAK2 V617F; Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com policitemia vera; Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com trombocitemia essencial e Determinar a prevalência da Mutação JAK2 V617F em pacientes com mielofibrose.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 013/09, considera APROVADO o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.c).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 27/5/2009


Ana Lúcia de Sena
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa-HEMOPE