



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA**



**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES EM
PACIENTES COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL**

EMANUELA VITÓRIA BARBOSA ALVES

**MANAUS
2023**

EMANUELA VITÓRIA BARBOSA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES EM
PACIENTES COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia.

Orientadora: **Prof^a. Dra. Andréa Monteiro Tarragô.**

Coorientadora: **Prof^a. Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão**

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

A474cc Alves, Emanuela Vitória Barbosa
Caracterização do perfil de microvesículas circulantes em
pacientes com Trombocitemia Essencial / Emanuela Vitória
Barbosa Alves. Manaus : [s.n], 2023.
98 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à
Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Tarragô, Andréa Monteiro

Coorientador: Mourão, Lucivana Prata de Souza

1. Trombocitemia Essencial. 2. Microvesículas. 3.
Neoplasias Mieloproliferativas. I. Tarragô, Andréa
Monteiro (Orient.). II. Mourão, Lucivana Prata de Souza
(Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV.
Caracterização do perfil de microvesículas circulantes em
pacientes com Trombocitemia Essencial



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 006/2023

Ao vigésimo sexto dia do mês de julho do ano de 2023, às 14h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação da discente **Emanuela Vitória Barbosa Alves**, sob o título: “**Caracterização do perfil de microvesículas circulantes em pacientes com trombocitemia essencial**”, tendo como orientadora a Prof^a. Dr^a. **Andréa Monteiro Tarragô** e coorientadora a Prof^a. Dr^a. **Lucivana Prata de Souza Mourão**, segundo encaminhamento da Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

| Membros | Parecer | Assinatura |
|---|--|------------------------------------|
| Prof. ^a Dr. ^a Andréa Monteiro Tarragô – Presidente (HEMOAM) | Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/> | Assinatura: CPF: 717.410892-04 |
| Prof. ^a Dr. ^a Leticia Gomes de Pontes – Membro (UFMG) | Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/> | Assinatura: CPF: 319.865698-29 |
| Prof. Dr. Nilberto Dias de Araújo – Membro (HEMOAM) | Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/> | Assinatura: CPF: 051.353.474-10 |

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

(x) Aprovado () Não Aprovado

Presidente da Banca Examinadora

Coordenação PPGH-UEA/HEMOAM

• Endereço: Avenida Constantino Nery, 4397 – Chapada
• Manaus-AM – CEP 69050-001 / • Fone: (92) 3655-0123
• E-mail: mestrado@hemoam.am.gov.br
• Site: <http://www.pos.uea.edu.br/hematologia>
• www.instagram.com/ppgh_uea



DEDICATÓRIA

A minha mãe, Ângela Maria, a pessoa mais forte que já conheci que me apoiou por toda a minha vida e ao longo dessa jornada acadêmica, sempre torcendo por mim. Mãe, sem você eu não estaria aqui obrigada por todo o amor e carinho. Eu amo você!

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Ângela que despertou em mim o amor pela leitura e por aprender coisas novas, obrigada por todo o incentivo e encorajamento, sem você eu já teria desistido inúmeras vezes ao longo do caminho.

A minha irmã, Vitória, pelo apoio, pela paciência em ouvir minhas reclamações e por todas as pequenas conversas que alegram meus dias, sem você eu não teria ninguém para rir das minhas referências a filmes, obrigada pela companhia nesses anos.

Ao meu irmão, Maciel, sua esposa Ielane e minhas duas adoráveis sombrinhas, por todo carinho e apoio que me dedicaram ao longo, não só do mestrado, como também da graduação. Obrigada pelas visitas que sempre alegram minha vida.

As amigas, Nayra Almeida e Paula Mascarenha, por me apoiarem e mesmo nos momentos difíceis não desistirem de mim, amo vocês.

A minha orientadora, Dra. Andréa Monteiro Tarragô, por toda a paciência de continuar insistindo em mim e por acreditar no meu potencial em momentos que eu mesmo não acreditei. Você tem sido meu exemplo como profissional e como pessoa. Obrigada por todas as dicas, carinho e atenção que tem me dado desde a iniciação científica até agora no mestrado, eu não consigo imaginar uma orientadora melhor para mim do que a senhora. Amo você!

A minha coorientadora Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão, seu amor por lecionar e por genética é lindo e me incentivaram a continuar na carreira acadêmica e a amar cada vez mais a genética e à docência, obrigada!

Ao Bruno Nascimento, aluno de iniciação científica que conheci quando ainda era Programa de Apoio a Iniciação Científica (PAIC) e que considero um grande amigo. Obrigada por me fazer companhia durante esses anos, por todas as risadas, por ouvir meus lamentos e por sempre me ajudar.

Aos membros da equipe de Neoplasias Mieloproliferativas, Dania Torres, Miliane Araújo, Iandara de Souza, Jhemerson Paes, Déborah Canté e Ericka Alves, por todo o seu apoio, disposição e por dividir as dificuldades do projeto.

Aos meus colegas do mestrado, em especial a Wivian da Silva e Geysel Soares, obrigada por todo o carinho e ajuda.

A equipe do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG), em especial a Dra. Andréa Teixeira-Carvalho, Marina Silvestrini e Armanda Barbosa.

A toda equipe do HEMOAM, aos funcionários do Laboratório de Genômica, MSc. Rechfy Abou-Ali, Dra. Nadja Garcia e Dra. Luciana Barbosa. A equipe da recepção do Laboratório Clínico do Hemoam, em especial a Thaila Silva e a equipe de coleta dos doadores de sangue.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), por oferecer toda a estrutura para a realização do projeto.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de fazer parte do programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD-Amazônia) pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A Trombocitemia Essencial (TE) é caracterizada pela proliferação desordenada megacariócitos na medula óssea, o que resulta em um aumento no número de plaquetas circulantes. A TE tem uma prevalência maior no sexo feminino entre a idade de 50 a 60 anos. As microvesículas (MVs) são um grupo heterogêneo de vesículas, originados na membrana plasmática das células saudáveis ou neoplásicas, o conteúdo e função depende da célula de origem, possui uma estrutura formada por uma bicamada lipídica e em seu interior existem lipídios, proteínas, mRNA e miRNA. Estudos indicam que as MVs participam de processos fundamentais na multiplicação e na formação do microambiente das células neoplásicas e possuem um importante papel no desenvolvimento do câncer no organismo. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil das microvesículas circulantes em pacientes com diagnóstico de Trombocitemia Essencial atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Os prontuários dos pacientes foram avaliados para coleta das características sociodemográficas e clínicas, realizamos exames laboratoriais para análises hematológicas, análises bioquímicas e testes da hemostasia. Para determinar a origem celular das MVs utilizamos a técnica de citometria de fluxo com anticorpos específicos: células progenitoras (CD34), células mieloides (CD13, CD33 e CD117), leucócitos (CD45), células dendríticas (CD11c), monócitos (CD14), neutrófilos (CD16 e CD66b), linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD19), células NK (CD56), plaquetas (CD41a), eritrócitos (CD235a) e células endoteliais (CD51/61). O grupo de pacientes com TE em tratamento com hidroxiureia possuíam um nível elevado de microvesículas circulantes totais e das populações de MVs CD34, CD13, CD33, CD11c, CD14, CD16, CD66b, CD3, CD19, CD56 e CD235a. O nível elevado dessas MVs demonstra que diversas populações de MVs podem estar envolvidas na patogênese da TE. O tratamento com hidroxiureia parece desempenhar um papel crucial na diminuição das MVs, o presente estudo encontrou uma associação entre a diminuição do número de MVs circulantes com o aumento do tempo de tratamento.

Palavras Chaves: Trombocitemia Essencial, microvesículas, Neoplasias Mieloproliferativas.

ABSTRACT

Essential thrombocythemia (ET) is characterized by clonal proliferation of megakaryocytes in the bone marrow, which results in an increase in the number of circulating platelets. ET has a higher prevalence in females between the ages of 50 and 60 years. Microvesicles (MVs) are a heterogeneous group of vesicles, originating in the plasma membrane of normal or neoplastic cells, their content and function depend on the cell of origin, their structure is formed by a lipid bilayer and inside there are lipids, proteins, mRNA and miRNA. Studies indicate that MVs participate in fundamental processes in the multiplication and formation of the microenvironment of neoplastic cells and play an important role in the development of cancer in the body. The aim of this study is to characterize the profile of circulating microvesicles in patients diagnosed with Essential Thrombocythemia treated at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. We will evaluate the medical records of patients to collect sociodemographic and clinical characteristics, perform laboratory tests for hematological analysis, biochemical analysis, and hemostasis tests. To determine the cellular origin of the MVs, the flow cytometry technique will be used with specific antibodies: progenitor cells (CD34), myeloid cells (CD13, CD33 and CD117), leukocytes (CD45), dendritic cells (CD11c), monocytes (CD14), neutrophils (CD16 and CD66b), T lymphocytes (CD3), B lymphocytes (CD19), NK cells (CD56), platelets (CD41a), erythrocytes (CD235a) and endothelial cells (CD51/61). The group of patients with ET on hydroxyurea treatment had a high level of total circulating microvesicles and populations of MVs CD34, CD13, CD11c, CD14, CD16, CD66b, CD3, CD19, CD56 and CD235a. The high level of these MVs demonstrates that different populations of MVs may be involved in the pathogenesis of ET. Hydroxyurea treatment seems to play a crucial role in decreasing MVs, the present study found an association between the decrease in the number of circulating MVs with increasing treatment time.

Keywords: Essential Thrombocythemia, Microvesicles, Myeloproliferative neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Processo de Hematopoiese..... | 4 |
| Figura 2. Caso clínico de TE positivo para a variante genética do gene CALR | 7 |
| Figura 3. Localização das mutações Drives e frequência estimada. | 9 |
| Figura 4. Biogênese das microvesículas..... | 14 |
| Figura 5. Estrutura, componentes e funções das microvesículas | 15 |
| Figura 6. Interação ligante-receptor realizado pelas microvesículas | 16 |
| Figura 7. Captação e destino das microvesículas..... | 17 |
| Figura 8. Marcadores celulares e suas funções..... | 24 |
| Figura 9. Atuação das microvesículas no organismo..... | 24 |
| Figura 10. Microvesículas na Trombocitemia Essencial..... | 26 |
| Figura 11. Fluxograma de obtenção e processamento das amostras..... | 32 |
| Figura 12. Fluxograma da imunofenotipagem das microvesículas..... | 34 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Critérios diagnósticos da Trombocitemia Essencial segundo a OMS..... | 8 |
| Quadro 2. Características das vesículas extracelulares..... | 12 |
| Quadro 3. Painel para imunofenotipagem das populações de MVs..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

AAS: Ácido Acetilsalicílico

ARF6: Fator de Ribosilação do ADP 6

ARRDC1: proteína 1 contendo domínio de arrestina

BCR: *BCR activator of RhoGEF and GTPase.*

CALR: Calreticulina.

CEACAM8: Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 8

ESCRT: Complexo de Triagem Endossomal Necessário para Transporte

EXOs: Exossomos

FE: fosfatidiletanolamina

FIOCRUZ-MG: Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais -Instituto René Rachou

FMT: Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira-Dourado

FS: fosfatidilserina

FVW: Fator de von Willebrand

GIPB: Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores

GPA: Glicoforina A

HEMOAM: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

HEMOAM: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

HU: Hidroxiureia

IPCCB: Laboratório Multiusuário do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema

JAK2: Janus quinase 2.

LMC: Leucemia Mielóide Crônica.

MPL: Receptor da Trombopoietina.

MVs: Microvesículas

MVs-CE: Microvesículas derivadas de Células Endoteliais

MVs-CLs: Microvesículas derivadas de Células Leucêmicas

MVs-E: Microvesículas derivadas de Eritrócitos

MVs-L: Microvesículas derivadas de Leucócitos

MVs-LIN: Microvesículas derivadas de Linfócitos

MVs-MAC: Microvesículas derivadas de Macrófagos

MVs-MON: Microvesículas derivadas de Monócitos

MVs-NEU: Microvesículas derivadas de neutrófilos

MVs-NK: Microvesículas derivadas de células Natural Killer

MVs-P: Microvesículas derivadas de Plaquetas

NCA-95: Antígeno inespecífico de reação cruzada

NK: Natural Killer

OGs: Oncossomas Grandes

NMP: Neoplasias Mieloproliferativas

OMS: Organização Mundial da Saúde

PDCD6IP: Proteína que interage com a morte celular programada 6

PV: Policitemia Vera.

TE: Trombocitemia Essencial.

TSG101: proteína do gene de suscetibilidade a tumores 101

VE: Vesículas Extracelulares

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 1.1. Hematopoiese | 3 |
| 1.2. Neoplasias Mieloproliferativas | 4 |
| 1.3. Histórico | 5 |
| 1.4. Trombocitemia Essencial | 6 |
| 1.4.1. Fisiopatologia da Trombocitemia Essencial | 8 |
| 1.5. Vesículas Extracelulares | 11 |
| 1.6. Microvesículas | 12 |
| 1.6.1. Biogênese das microvesículas | 13 |
| 1.6.2. Conteúdo das microvesículas | 15 |
| 1.6.3. Tipos de microvesículas e seus marcadores celulares | 17 |
| 1.6.4. Microvesículas na Trombocitemia Essencial | 24 |
| 2. OBJETIVOS | 28 |
| 2.1. Objetivo Geral | 28 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 28 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 3.1. Tipo de estudo | 29 |
| 3.2. Área de estudo | 29 |
| 3.3. População de Estudo | 29 |
| 3.4. Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão | 29 |
| 3.5. Aspectos éticos | 30 |
| 3.6. Coleta de dados clínicos e laboratoriais | 30 |
| 3.7. Testes da avaliação da hemostasia | 31 |
| 3.8. Análises Bioquímicas | 31 |
| 3.9. Análises Hematológicas | 32 |

| | |
|--|----|
| 3.10. Imunofenotipagem de Microvesículas | 33 |
| 3.11. Análise estatística | 35 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| Perfil de microvesículas circulantes em pacientes com trombocitemia essencial em uso de hidroxureia | 36 |
| 5. CONCLUSÃO | 64 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |
| 7. ANEXOS | 74 |
| 7.1. PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA E PESQUISA (CEP) | 74 |
| 7.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) | 79 |
| 7.3. INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS | 83 |

INTRODUÇÃO

A hematopoiese é o processo responsável pela renovação celular e o fornecimento de células para o sangue ¹. Algumas variações genéticas podem ocasionar uma desordem ao longo da hematopoiese e levar a uma patologia ².

As Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) são um grupo de doenças que incluem oito neoplasias associadas a desordem da hematopoiese da linhagem mieloide. Neste grupo estão incluídas: Leucemia Mieloide crônica, Trombocitemia Essencial, Policitemia Vera, Mielofibrose Primária, Leucemia Neutrófila Crônica, Leucemia Eosinofílica Crônica, Leucemia Mielomonocítica Juvenil e Neoplasia Mieloproliferativa Inclassificável. A Trombocitemia Essencial (TE) faz parte das NMPs, do subgrupo de BCR::ABL1 negativas ³.

A principal característica da Trombocitemia Essencial é a proliferação exacerbada de megacariócitos na medula óssea, o que resulta em uma trombocitose no sangue periférico ⁴. Possui uma incidência de 1,5–2,0 casos por 100.000 habitantes por ano, com maior prevalência no sexo feminino durante a idade de 50 a 55 anos ⁵. Para que o diagnóstico seja realizado, o paciente deve atender aos critérios: contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9 /L$, aumento de megacariócitos na medula óssea, presença de uma variante genética nos genes *JAK2*, *MPL* ou *CALR*, sem critérios para outras NMP e ausência de trombocitose reativa ^{6,7}.

Essas variantes podem ocasionar uma hiperativação da via JAK/SAT, levando a uma proliferação celular desordenada, que é um dos principais mecanismos patogênicos na TE. Porém a fisiopatologia da TE é complexa e não está completamente elucidada, sabe-se que para o desenvolvimento e progressão das células neoplásicas é necessário um microambiente favorável. Diversas células atuam para criar este microambiente, liberando citocinas que vão iniciar o processo inflamatório. Este microambiente torna possível a proliferação das células neoplásicas e a sobrevivência, evitando que sejam destruídas pelo sistema imune. Este microambiente inflamatório pode também ser associado ao quadro de inflamação crônica encontrados nesses pacientes ^{8,9}.

Esse microambiente inclui a comunicação de diversas células e acredita-se que as microvesículas participam de processos fundamentais na proliferação da TE e na regulação do

microambiente celular desempenhando um importante papel no desenvolvimento da neoplasia no organismo ¹⁰.

As vesículas extracelulares foram documentadas como parte essencial da fisiologia e da patologia de diversas doenças, são liberadas por todos os tipos de células, possuem a capacidade de transportar moléculas, sinalização celular e modulação do ambiente extracelular ^{11, 12}.

As microvesículas são um subgrupo das Vesículas Extracelulares, originadas da membrana plasmática das células. O conteúdo das MVs é derivado da célula de origem, podendo ser lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros ¹³. Tem uma estrutura formada por uma bicamada lipídica e na superfície existem receptores de membrana da célula-mãe, fosfatidilserina e fator tecidual ¹⁴.

O conteúdo das microvesículas depende da célula de origem e do estímulo de liberação, como por exemplo, as microvesículas derivadas de plaquetas (MVs-P) são a população circulantes de MVs mais abundante no organismo e dispõem de diferentes estímulos de liberação como: uma resposta ao estresse de cisalhamento, a trombina, ao ionóforo de cálcio, ao ADP, entre outros ¹⁵.

Desse modo na TE em que um processo patológico está ocorrendo causando inflamação, dano e estresse para o organismo existe uma constante ativação celular que pode ocasionar liberação das MVs e assim aumentar o nível das MVs circulantes ¹⁶.

Portanto, o estudo foi realizado com o intuito de compreender a fisiopatologia da TE e contribuir com o entendimento do papel das Mvs a partir do perfil delineado na população de pacientes com diagnóstico de Trombocitemia Essencial atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.Hematopoiese

O processo de renovação celular é denominado Hematopoiese, ocorre na medula óssea e envolve células-tronco hematopoiéticas, endoteliais, osteoblastos, osteoclastos e células-tronco mesenquimais, essas células interagem entre si e são responsáveis pelo complexo processo de hematopoiese ¹. O sistema hematopoiético libera cerca de 100 bilhões de células maduras por dia, essas células são essenciais para a manutenção e sobrevivência do corpo humano ¹⁷.

Esse complexo processo de diferenciação se inicia com as células-tronco hematopoiéticas se diferenciando na linhagem mieloide ou linfóide e termina na maturação dessas células. Em processos inflamatórios crônicos, no envelhecimento ou em algumas patologias as células-tronco podem dar origem a uma célula madura diretamente sem passar pelas etapas de diferenciação ¹⁸.

O clássico modelo de hematopoiese mostra apenas os dois ramos principais de diferenciação: a linhagem mielóide e linfóide. As células maduras mielóides são: os eritrócitos que atuam no transporte de oxigênio, as plaquetas que exercem a função de coagulação do sangue, os monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células dendríticas que fazem parte do sistema imune, responsável pela primeira defesa do organismo contra patógenos. As células da linhagem linfóide são: linfócitos B, linfócitos T e células NK, essas células também fazem parte do sistema imune e os linfócitos são os principais responsáveis pela imunidade adaptativa ¹⁹. O modelo do processo de diferenciação celular está exemplificado de forma simples na figura 1.

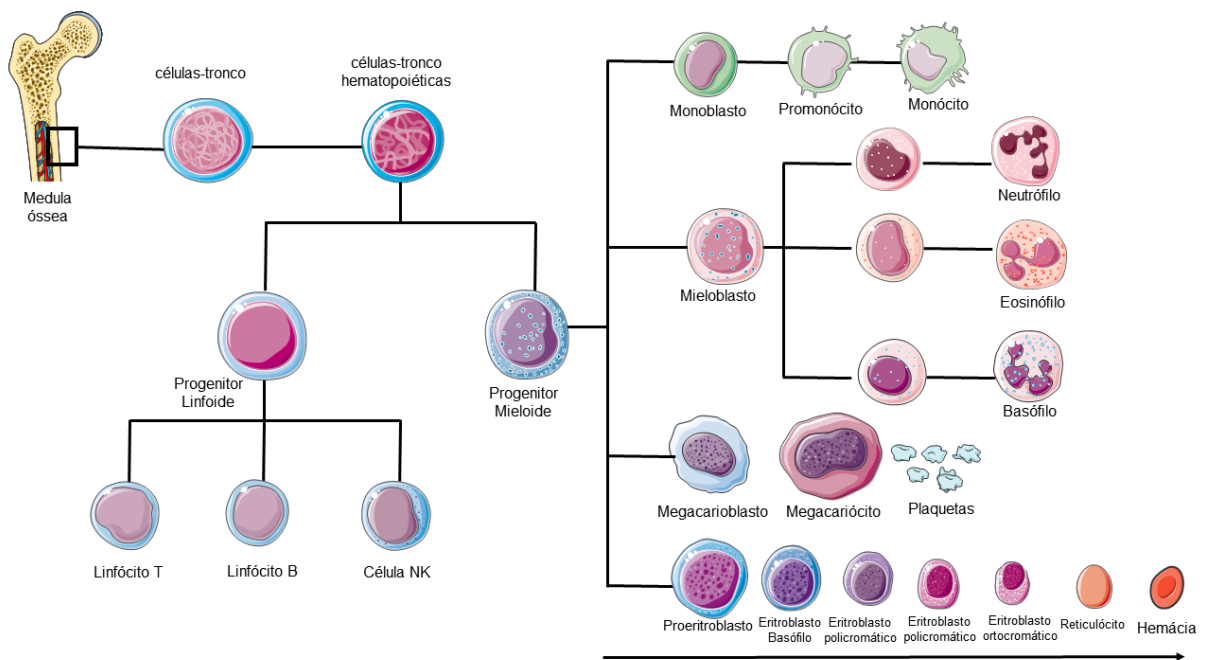


Figura 1. Processo de Hematopoiese.
Fonte: Adaptado de Hoffbrand, 2016 ⁵.

Algumas neoplasias causam uma desordem nesse complexo processo de hematopoiese, como as neoplasias mieloproliferativas (NMPs), síndrome mielodisplásica (SMD) e leucemia mieloide aguda (LMA). Essas doenças ocasionam uma proliferação desordenada de uma ou mais linhagem mieloide, uma autorrenovação anormal ou um defeito na diferenciação das células. A causa dessas neoplasias pode ser alterações genéticas, epigenéticas ou alterações funcionais nas células residentes na medula óssea ².

1.2. Neoplasias Mieloproliferativas

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o grupo de Neoplasias mieloproliferativas inclui a leucemia mieloide crônica, trombocitemia essencial, policitemia vera, mielofibrose primária, leucemia neutrofílica crônica, leucemia eosinofílica crônica não especificada e neoplasia mieloproliferativa crônica inclassificável ³.

As neoplasias mieloproliferativas são doenças crônicas, em que ocorre uma proliferação desordenada de células maduras e funcionais. As NMP afetam uma ou mais linhagem de células mielóides, podem afetar eritrócitos, plaquetas ou granulócitos e em alguns casos podem evoluir

para crise blástica. Mais frequentemente são diagnosticadas entre a idade de 50 a 70 anos. Os sintomas estão relacionados ao aumento de células circulante e podem levar a eventos trombóticos ou hemorrágicos e frequentemente são encontrados esplenomegalia, hepatomegalia²⁰.

As NMP possuem uma heterogeneidade clínica e os seus sintomas e complicações estão associados a variante genética encontrada. A LMC é caracterizada pela presença da translocação *BCR::ABL1*, mas a policitemia vera, a trombocitemia essencial e a mielofibrose vão apresentar as chamadas mutações *Drives*, esse grupo inclui as variantes nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR*. Essas três neoplasias, portanto, são divididas em um subgrupo denominado neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas^{21,22}.

1.3.Histórico

Uma das primeiras descrições das neoplasias mieloproliferativas foi feita pelo patologista John Bennet em 1845, que relatou um caso em que o paciente apresentava hepatoesplenomegalia e foi a óbito devido a “supuração do sangue”. Apesar do autor ter relatado o caso como um processo infeccioso, acredita-se que este seja um caso de leucemia mieloide crônica²³. Rudolf Virchow descreveu um caso similar, definiu a doença como uma desordem neoplásica e nomeou como leucemia em 1847²⁴.

A nomenclatura doenças mieloproliferativas foi criada por William Dameshek em 1951 e neste grupo foi incluído a leucemia mieloide crônica, policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária e eritroleucemia²⁵.

Peter Nowell e David Hungerford em 1960, descobriram a primeira anomalia cromossômica que poderia ser correlacionada diretamente a uma neoplasia maligna, o Cromossomo Filadélfia que foi identificado em pacientes com LMC²⁶. Essa descoberta revolucionou a forma de diagnóstico das neoplasias e abriu caminho para a descoberta de muitas outras variantes genéticas.

Caspersson em 1973 conseguiu caracterizar citogeneticamente o cromossomo Filadélfia, essa caracterização possibilitou que as NMPs fossem divididas em um subgrupo denominado Ph-negativos²⁷. A variante genética *JAK2V617F* foi encontrada em pacientes Ph negativos por

quatro laboratórios diferentes, o que ajudou a determinar que essa variante genética era frequentes nessas neoplasias ^{28,29,30,31}.

A segunda mutação *Drive* a ser identificada foi a *MPLW515L* no gene *MPL* em 2006, logo em seguida foi a variante genética no éxon 12 do gene *JAK2* em 2007 e em 2013 foi identificada a variante genética localizada no éxon 9 do gene *Calreticulina* ^{32,33,34,35}.

A descoberta dessas variantes genéticas possibilitou a compreensão da fisiopatologia, otimização do diagnóstico e o desenvolvimento de tratamentos novos e mais específicos. A OMS vem demonstrando a importância e relevância destas descobertas, a cada publicação do livro de Classificação de Tumores de Tecido Hematopoiético e Linfóide, que contém atualizações das informações genéticas de diversas doenças, a publicação desses dados é um passo fundamental para a padronização do diagnóstico das NMP. Em 2001 foi realizado a primeira incorporação dessas informações, com uma atualização em 2008, uma em 2017 e a mais recente publicada em 2022 que revisou os critérios de diagnósticos das neoplasias e adicionou a Leucemia Mielomonocítica ao grupo de NMP ^{36,37,3}.

1.4. Trombocitemia Essencial

A Trombocitemia Essencial é uma neoplasia mieloproliferativa caracterizada pelo aumento do número de megacariócitos maduros na medula óssea e uma acentuada trombocitose no sangue periférico. A maior parte dos pacientes se mostram assintomáticos com a suspeita clínica ocorrendo somente após a realização de um hemograma, quando encontrado o valor de contagem de plaquetas de $\geq 450 \times 10^9 /L$. O risco de mortalidade pela doença está associado a eventos trombóticos ou hemorrágicos ^{4,38}.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a incidência mundial da TE é 1,5-2,0 casos a cada 100.000 habitantes, com incidência maior entre 50 a 55 anos e com maior predomínio no sexo feminino ⁵. No Brasil a epidemiologia da doença ainda é desconhecida, mas a incidência encontrada em outros países não difere da estimativa da OMS. Nos Estados Unidos, a incidência é de 1–2,5 casos, com uma prevalência de 38-57 casos por 100.000 habitantes, com predominância no sexo feminino e na idade de 58 anos ³⁹. Na Suécia, a incidência encontrada foi de 1,53–1,66 casos a cada 100.000 pessoas por ano, com o diagnóstico mais frequente em pacientes acima de 70 anos ⁴⁰.

Os pacientes com TE podem apresentar diversos sintomas dependendo da quantidade de megacariócitos e plaquetas, os sintomas mais leves podem ser cefaleia, febre, prurido, distúrbios visuais, angina, parestesias, eritromelalgia, esplenomegalia leve e leucocitose. Em caso de trombocitose extrema pode ocorrer eventos mais graves como oclusões microvasculares envolvendo pequenos vasos, desenvolvimento de trombose nos vasos esplâncnicos (síndrome de Budd-Chiari) ou seio venoso cerebral, trombose de grandes vasos, trombose venosa profunda, eventos hemorrágicos ou embolia pulmonar ^{41,42}.

O diagnóstico da Trombocitemia Essencial é feito com base em alguns critérios: contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9 /L$, avaliação morfológica da medula óssea para verificar se há um aumento da linhagem megacariocítica. A presença de uma das três mutações *Driver* e a exclusão de outras causas de trombocitose (reativa e clonal) ⁶. A figura 2 mostra uma biopsia de medula óssea de um caso positivo de TE.

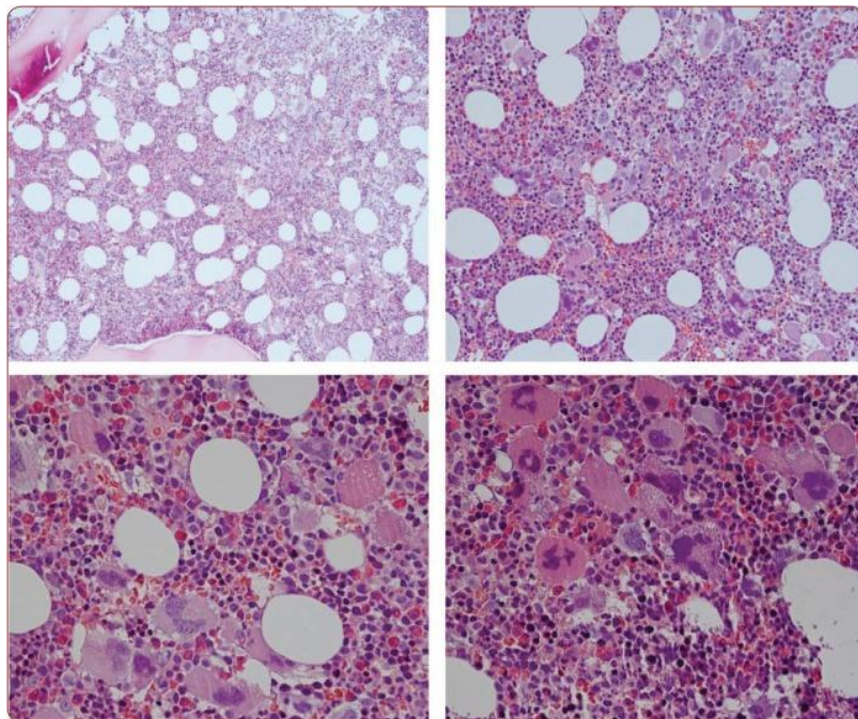


Figura 2. Caso clínico de TE positivo para a variante genética do gene *CALR*.

Fonte: OMS, 2016 ⁴³.

Segundo a OMS para que o diagnóstico seja estabelecido é necessário que seja determinado pelo menos quatro critérios maiores ou três critérios maiores e um menor ⁴⁴. O quadro 1 mostra quais são os critérios requeridos pela OMS.

Quadro 1. Critérios diagnósticos da Trombocitemia Essencial segundo a OMS. **Fonte:** Swerdlow, 2017 ⁴⁵.

| Critérios maiores |
|--|
| 1- Contagem plaquetario $> 450 \times 10^9/L$ 2- Medula óssea com proliferação da linhagem megacariocítica, com número aumentado de megacariócitos grandes e maduros 3- Sem critérios para PV, MFP, LMC, síndromes mielodisplásicas e outras neoplasias mielóides. 4- Presença da mutação <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> |
| Critério Menor |
| 1- Demonstração de um marcador clonal ou ausência de Trombocitose reativa. |

O tratamento da TE é focado principalmente em reduzir o risco de eventos trombóticos e hemorrágicos diminuindo o número de plaquetas circulantes. Portanto o tratamento inicial é a citorredução, atualmente existem três drogas indicadas hidroxiuréia, interferon e anagrelida, pacientes que apresentem distúrbios microvasculares podem ser tratados com ácido acetilsalicílico ⁴⁶.

1.4.1. Fisiopatologia da Trombocitemia Essencial

A fisiopatologia da Trombocitemia Essencial é multifacetada e não foi completamente elucidada. Este processo envolve a interação celular de diversos fatores como a hiperviscosidade, aumento do nível de hemácias, ativação de plaquetas e leucócitos, a cascata de coagulação, as células endoteliais, citocinas e os mediadores liberados pelas células neoplásicas. Uma das principais características da TE é a hiperativação da via JAK/STAT que é ocasionada pelas variantes encontradas nos três genes *Drives*. A variante JAK2V617F aparece em 50-60 % dos casos, a variante no éxon 9 do gene *CALR* (tipo 1, 52-pb deleção e tipo 2, 5-pb inserção) é encontrada em 30% dos casos e a variante no gene *MPL* a *W515L* é encontrada em 3% dos casos ^{8, 47, 48}. A figura 3 mostra os genes de cada mutação *drive* e a frequência estimada em cada NMP.

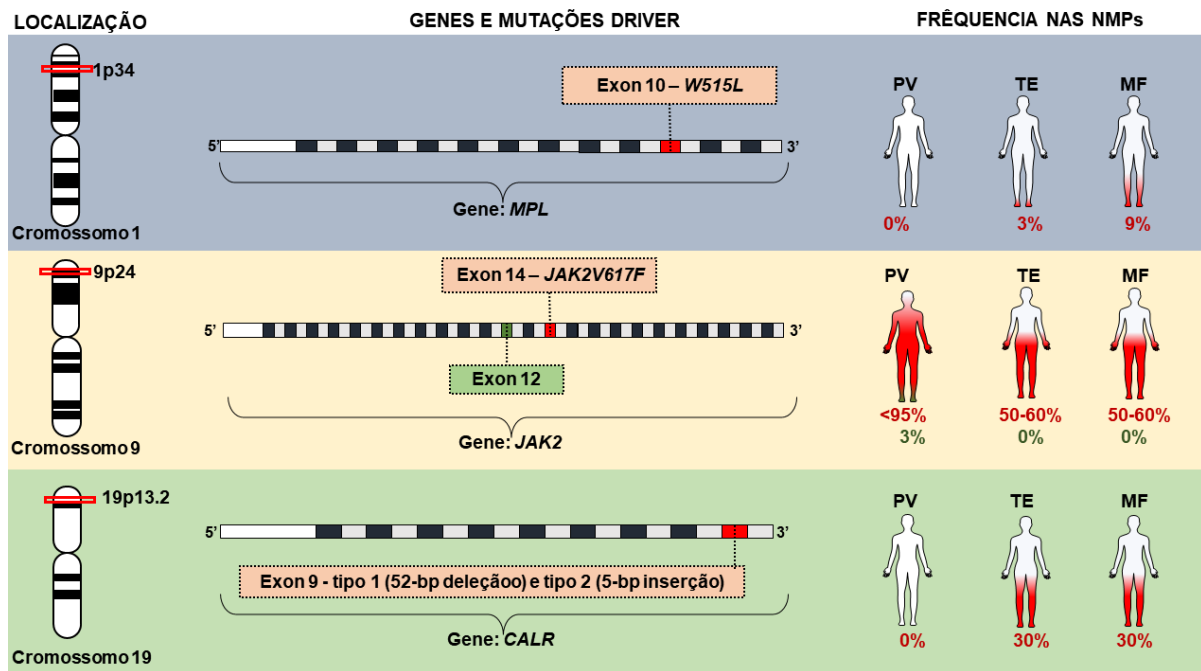


Figura 3. Localização das mutações *Drives* e frequência estimada.

Fonte: Torres, 2022⁴⁷

A sinalização do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) é responsável por diversos processos atuando na homeostase, hematopoiese, imunidade, inflamação, reparo tecidual, adipogênese e apoptose. A via JAK/STAT consiste em quatro genes para proteínas JAK: JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 e possuem a capacidade de interagir com sete proteínas STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6). Desta forma as proteínas JAK possuem a função de se associar a diferentes receptores na superfície celular e ativar cascatas de sinalizações e a hiperativação desta via leva proliferação celular desordenada^{49, 50}.

O gene JAK2 é formado por um domínio de pseudoquinase denominado JH2 e um domínio de tirosina quinase nomeado JH1. O papel do domínio JH2 é inibir a atividade do domínio JH1, porém a variante genética *JAK2V617F* ocasiona a ativação constante da via JAK/STAT. A variante é resultado da mudança de uma valina por uma fenilalanina na posição 617 do domínio JH2, que impede que ele atue inibindo o JH1 levando a uma hiperproliferação e desregulação da via JAK/STAT⁵¹.

Essa alteração afeta várias outras vias como dos receptores de eritropoietina (EPO), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF) e trombopoietina (TPO) vias responsáveis por regular a

produção das linhagens eritróides, megacariocíticas e granulocíticas, assim essa variante pode ocasionar proliferação celular desordenada e resistência à apoptose ⁴⁷.

A descoberta das variantes do gene *JAK2* ajudou na compreensão da fisiopatologia da TE, porém os mecanismos que iniciam a sinalização da via desregulada ainda não estão completamente esclarecidos, sabe-se que a variante *JAK2V617F* precisa interagir com receptores de citocinas fazendo com que as células se tornem mais sensíveis à estimulação de citocinas o que acaba influenciando o fenótipo da doença ⁵².

As citocinas são moléculas compostas por proteínas ou glicoproteínas responsáveis por mediar o processo inflamatório atuando no sistema imune recrutando células efetoras e são liberadas por células imunes e epiteliais em resposta infecções, lesão ou estresse. Para o funcionamento correto do organismo é necessário que exista um equilíbrio das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e o quadro inflamatório da TE pode estar relacionado a desregulação dessas citocinas ⁵³.

As citocinas encontradas em excesso em pacientes com NMP foram as interleucinas (ILs): IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-17, os fatores de necrose tumoral (TNFs) e fatores de crescimento celular (TGF). A maioria das citocinas encontradas possuem função pró-inflamatórias como a IL1 ou pró-fibróticas como o fator de crescimento transformador beta (TGFB). Foram descritas algumas citocinas inflamatórias como CCL11 (eotaxina), CXCL1 (GROa), fator de crescimento epidérmico (EGF) e mediadores químicos, como espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas citocinas atuam causando uma inflamação crônica que impulsiona a progressão da neoplasia ⁵⁴.

Diferentes células atuam neste processo inflamatório liberando citocinas como as células-tronco e progenitoras hematopoiéticas mutantes e normais, células estromais mesenquimais, megacariócitos, monócitos, plaquetas e células endoteliais ⁵⁵. Este microambiente inflamatório desempenha um importante papel na patogênese da TE proporcionando um ambiente propício para que as células neoplásicas perpetuem. Em decorrência da inflamação células endoteliais e plaquetas podem produzir mais selectina solúveis e menos óxido nítrico o que contribui para um microambiente pró trombótico. Sendo assim este microambiente tumoral se torna imprescindível para o desenvolvimento e progressão da doença tornando possível a evasão das células neoplásicas do sistema imune, propagação celular e levando os pacientes a apresentarem complicações clínicas ^{9, 56}.

1.5. Vesículas Extracelulares

O termo vesícula extracelular (VE) se refere a partículas com uma camada bifosfolipídica, que não possuem núcleo e são liberadas por todos os tipos de células durante a ativação celular ou apoptose. Essas VE atuam no transporte de moléculas bioativas e possuem a capacidade de modular o ambiente extracelular, alterar o conteúdo e comportamento das células receptoras, exercendo um papel importante no transporte de informações parácrinas ^{11,12}.

Durante um longo tempo após a descoberta as VEs eram consideradas apenas restos celulares. Nos últimos anos com o avanço das tecnologias de detecção e caracterização das VEs foi possível compreender o papel das VEs na fisiologia do organismo, descobrindo que atuam em diversos processos fisiológicos, como por exemplo, na homeostase, na coagulação, na regulação e expansão de células e em diferentes patologias como no câncer, inflamação, infecção, entre outros ⁵⁷.

As vesículas extracelulares são divididas em grupos dependendo do seu mecanismo de biogênese e tamanho, atualmente há três categorias que são consideradas principais: os exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Os exossomos são formados no citoplasma da célula, as vesículas intraluminais se acumulam nos corpos multivesiculares até ocorrer a fusão com a membrana plasmática e liberação por exocitose. Os exossomos possuem o tamanho entre 30 a 150 nm. As microvesículas (MVs), também conhecidas como micropartículas ou ectossomos, são formadas na membrana plasmática das células e liberadas por brotamento de membrana e possuem o tamanho de 100 a 1000 nm. Os corpos apoptóticos são formados no final da apoptose da célula e considerados uma das maiores VEs possuindo o tamanho de 1000 a 5000 nm. ^{13,58,59} As características principais destes três subgrupos de VEs estão descritas no Quadro 2.

Os exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos são considerados os três subgrupos tradicionais de VEs e a heterogeneidade de tamanho, carga, funções e evidências da importância clínica estão bem descritos. Existem outros subgrupos de vesículas que vem demonstrando relevância, como por exemplo, os oncosomas grandes, liberados por células cancerígenas e vesículas de tamanho micro, como, os migrassomas ou os recentemente descobertos exômeros ^{60,61}.

Quadro 2. Principais características dos exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos.Fonte: Adaptado de Stahl, 2019¹³.

| | Exossomos | Microvesículas | Corpos apoptóticos |
|--------------------------------|---|---|---|
| Tamanho | 30-100 nm | 50-1.000 nm | 1–5 µm |
| Origem | Vesículas intraluminais dentro de corpos multivesiculares | Membrana plasmática | Membrana plasmática, fragmentos celulares |
| Mecanismo de formação | Fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática | Borbulhamento externo da membrana plasmática | Encolhimento celular e morte celular programada |
| Estímulo para liberação | Ativação constitutiva e / ou celular | Ativação constitutiva / ou celular | Apoptose |
| Tempo de formação | Dez minutos ou mais | Alguns segundos | - |
| Composição Da Membrana | Enriquecido em colesterol e ceramida, expõe fosfatidilserina, contém jangadas lipídicas | Fosfatidilserina, enriquecida em colesterol e diacilglicerol, contém jangadas lipídicas | - |
| Componentes | Proteínas, mRNA, miRNA, siRNA, lipídios | Proteínas, mRNA, miRNA, siRNA, lipídios | Organelas celulares, proteínas, frações nucleares, DNA, RNA codificador e não codificador, lipídios |

1.6. Microvesículas

As microvesículas são micropartículas esféricas com uma bicamada lipídica, sem núcleo, mas que carregam biomoléculas como, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, esse conteúdo depende da célula de origem e do estímulo recebido, como por exemplo, durante a ativação celular, como os leucócitos, eritrócitos, plaquetas, células endoteliais, células nervosas, entre outras. Por serem liberadas por todos os tipos de células, com um conteúdo diversificado que se altera dependendo do estímulo, presença em praticamente todos os fluidos corporais, as MVs desempenham um importante papel na comunicação intercelular e a caracterização delas se torna imprescindível para melhor entendimento da patogênese das doenças^{62,63}.

1.6.1. Biogênese das microvesículas

A biogênese das microvesículas ocorre em dois processos o borbulhamento da membrana plasmática em que a membrana fica assimétrica formando uma curva com o citoesqueleto se reorganizando e depois a clivagem, necessária para que as MVs se separem da membrana da célula ⁶⁴.

O borbulhamento da membrana ocorre nas chamadas jangadas lipídicas, microdomínios ricos em lipídios regulados por diversos fatores. O processo de biogênese é iniciado pelo aumento do cálcio intracelular que estimula proteínas sensíveis ao cálcio, como proteínas transmembranas transportadoras de aminofosfolipídios responsáveis por manter a assimetria fisiológica da membrana plasmática e transportar moléculas. Existem três proteínas responsáveis por essas funções a flippase que continuamente internaliza a fosfatidilserina (FS) e a fosfatidiletanolamina (FE), a floppase que é responsável por exteriorizar essas proteínas e a scramblase que pode internalizar ou exteriorizar esses aminofosfolipídios. Devido ao aumento do Ca^{2+} a flippase é inibida e a floppase e a scramblase começam a deslocar a FS para a superfície da membrana. A quantidade de FS externalizado depende do nível de estimulação de enzimas sensíveis ao cálcio, como a calpaína e gelsolina, responsáveis pela reorganização e clivagem dos componentes do citoesqueleto como a actina e a filamina que conseqüentemente levam a liberação da vesícula ^{65, 66}.

O fator 6 de ribosilação de ADP (ARF6) participa da biogênese desempenhando um papel crítico no tráfego de carga para a superfície celular, na remodelação da actina periférica e na liberação das microvesículas da superfície celular. O ARF6 inicia uma cascata de sinalização com a ativação da fosfolipase D (PLD) que recruta as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) que fosforila e ativa as enzimas quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) que ativam a cadeia leve de miosina (MLC), ocasionando a contração da actomiosina facilitando a liberação da Mvs. Esse processo pode ser promovido pela atividade da proteína RhoA, que regula os rearranjos do citoesqueleto de actina através da via RhoA-cofilina que é iniciada através das quinases associadas a Rho (ROCK) e quinases LIM (LIMK) que fosforizam a cofilina e evitam que a cofilina corte os filamentos de actina, prologando essas fibras, esse alongamento forma uma estrutura chamada “anel de actina” uma etapa fundamental para a maturação das MVs ^{67, 68, 69}.

Outras proteínas auxiliam no processo de biogênese como: a proteína do gene de suscetibilidade a tumores 101 (TSG101), a proteína que interage com a morte celular programada 6 (PDCD6IP) e a proteína 1 contendo domínio de arrestina (ARRDC1). A abscisão citocinética é realizada usando ESCRT-III e PDCD6IP. Os ácidos nucleicos e proteínas podem ser processados e transportados para o domínio citoplasmático durante um processo chamado empacotamento, mediado pela maquinaria de classificação molecular como, por exemplo, complexo de triagem endossomal (ESCRT). A liberação da MV é facilitada com a ativação da A-SMase (esfingomielinase ácida) que transloca para o folheto externo e hidrolisa a esfingomielina em ceramida e aumenta o fluxo de colesterol ajudando a promover a curvatura da membrana^{70, 71, 72}. A figura 4 representa o processo de biogênese das microvesículas.

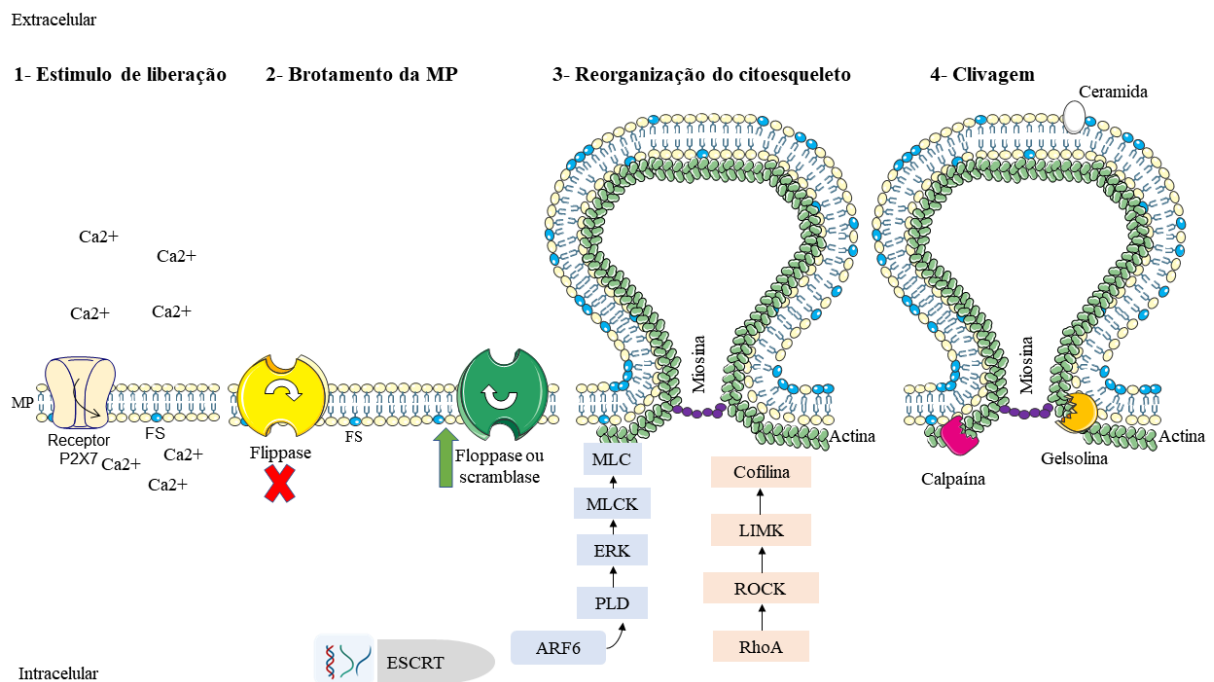


Figura 4. Biogênese das microvesículas. 1. Quando o trifosfato de adenosina extracelular (ATP) aumenta em resposta a estímulos externos, o receptor abre e os íons de cálcio entram na célula 2. Quando ocorre o aumento de Ca^{2+} a flippase é inibida e a floppase e a scramblase deslocam a FS para o folheto externo da bicamada. 3. O borbulhamento da membrana é iniciado, o ARF6 é ativado a fosfolípase D que inicia uma cascata que ativa a miosina que interage com a actina, que com o auxílio de algumas proteínas reorganiza e cliva a MV. 4. A ceramida pode ajudar a reorganizar o citoesqueleto e a clivagem pode ser realizada também por enzimas sensíveis a cálcio como a calpaína e a gelsolina.

Fonte: Autoria própria.

1.6.2. Conteúdo das microvesículas

As microvesículas transportam diversas biomoléculas como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, metabólitos, fatores de crescimento e citocinas. Podem ser encontradas nas MVs proteínas de sinalização, receptoras, de citoesqueleto, efetoras e algumas proteínas apresentadas na superfície das MVs podem ser diferentes da célula de origem, pois as proteínas são incorporadas seletivamente moduladas por ativadores agonistas ou pelo microambiente extracelular. Também são encontrados lipídios como colesterol, esfingolipídios e fosfolipídios, que garantem a rigidez da membrana das MVs. Alguns lipídios bioativos como, prostaglandinas, leucotrienos e enzimas do metabolismo lipídicos também foram detectados. Alguns dos metabólicos e enzimas transportados são: piruvato, lactato e isoformas de lactato desidrogenase ^{63, 73}.

As microvesículas podem apresentar em sua superfície dois receptores de membranas, o fator tecidual uma proteína transmembrana responsável por ativar o fator VIIa (FVIIa), que atua na hemostasia ativando a coagulação e a fosfatidilserina que é um importante fator que favorece a coagulação. Esses dois receptores de superfície concedem as MVs uma alta capacidade pró-coagulante ^{14, 70}. A estrutura e o conteúdo das microvesículas estão representados na figura 5.

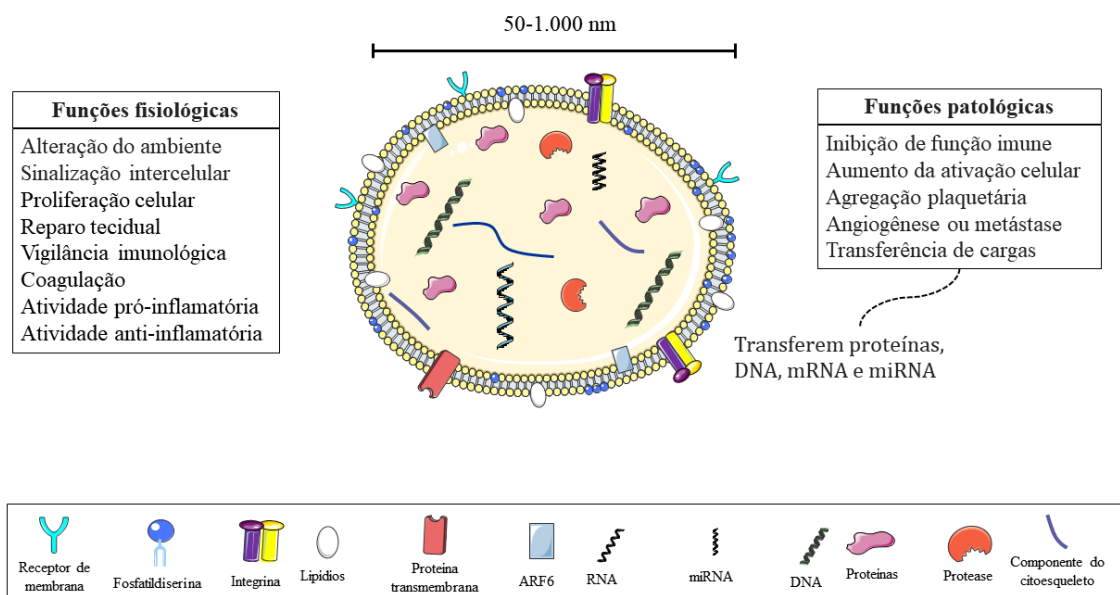


Figura 5. Estrutura, componentes e funções das microvesículas.

Fonte: Autoria própria.

A transferência dessas cargas é um processo estocástico, as MVs se movem pelo organismo interagem com a célula-alvo ou são eliminadas por degradação. Esta interação pode ser ligante-

receptor, em que uma proteína se liga a um receptor da célula-alvo, agindo na sinalização intercelular, modulação do microambiente ou apresentação de antígeno. Esta forma de comunicação celular vem sendo estudada principalmente pela capacidade de imunomodulação, como por exemplo, MVs que possuem o ligante 1 de morte programada (PD-L1) possibilitam a evasão imune por meio da inibição da função das células T ^{74, 75}. A figura 6 representa a interação das microvesículas com o receptor das células alvo.

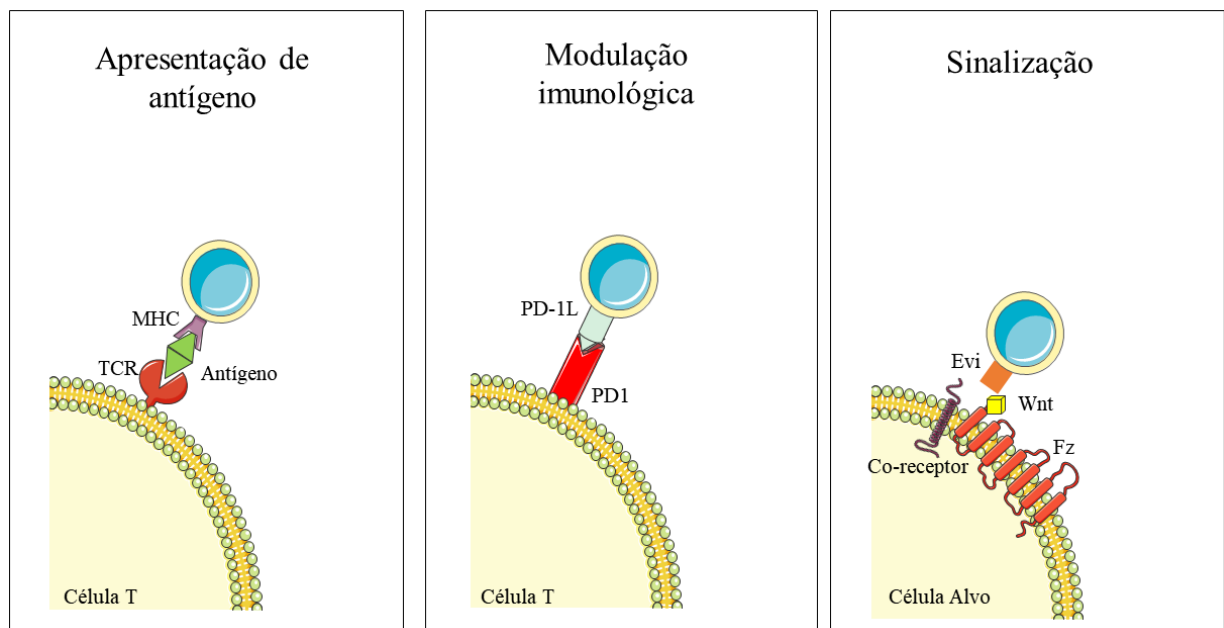


Figura 6. Interação ligante-receptor realizado pelas microvesículas.

Fonte: Adaptado de Teng, 2021 ⁷⁵.

O conteúdo das microvesículas pode ser transferido diretamente por diferentes meios como: fusão de membrana, endocitose mediada por receptor, endocitose mediada por caveolina, endocitose mediada por jangada lipídica, fagocitose ou macropinocitose. A fusão de membrana permite que o conteúdo da MV seja liberado diretamente no citoplasma da célula, as MVs se ligam a outras células realizando uma inserção na membrana dos segmentos hidrofóbicos de proteínas fusogênicas e os lipídios se reorganizam causando uma reestruturação proteica e ondulações na membrana. Depois de endocitadas podem se fundir a corpos multivesiculares e serem degradadas por lisossomos ou serem misturadas ao interior da célula. Um exemplo dessa comunicação pode ser a transferência de ácidos nucleicos, como os microRNAs (miRNAs) que podem regular negativamente as expressões de genes alvos, RNAs mensageiros (mRNAs)

podem ser traduzidos diretamente ⁷⁶. Os tipos de transferência de cargas e os destinos estão na figura 7.

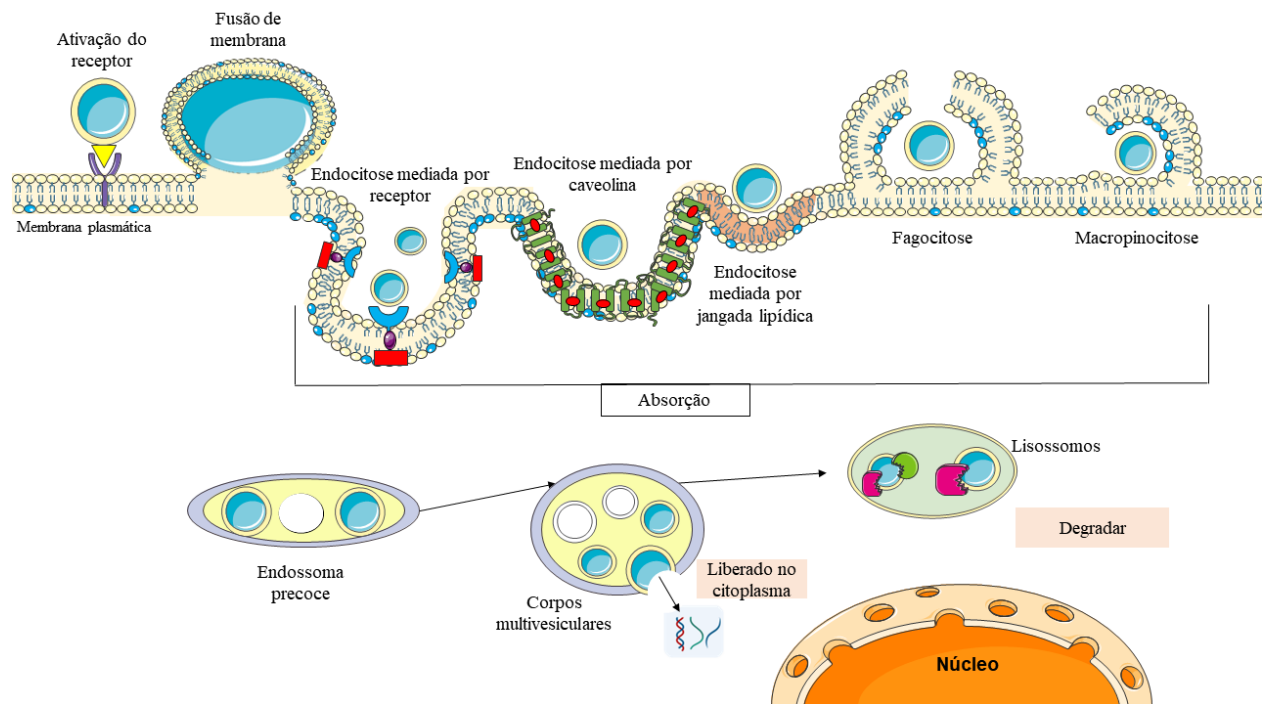


Figura 7. Captação e destino das microvesículas. Tipos de transferência de carga que as microvesículas realizam. Ativação de receptores da célula alvo, as MVs podem agir como apresentadores de antígenos, sinalizadores e moduladores do microambiente. Fusão de membrana em que a MV se liga diretamente a membrana da célula e transfere diretamente o conteúdo. Endocitose pode ser mediada por receptores, caveolina, por jangadas lipídicas, fagocitose ou macropinocitose, as MVs são absorvidas podendo ser degradadas ou se misturem ao interior da célula.

Fonte: Adaptado de Teng, 2021 ⁷⁵.

1.6.3. Tipos de microvesículas e seus marcadores celulares

- **Microvesículas derivadas de células progenitoras e mielóides**

Os marcadores encontrados nas microvesículas são derivados da célula de origem e para identificação da população das microvesículas é preciso selecionar os principais marcadores dessas células. As células progenitoras hematopoiéticas possuem a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em qualquer célula da linhagem mieloide ou linfóide. Para identificar essas células utiliza-se o anticorpo monoclonal Anti-CD34 ⁷⁷. O CD34 é uma fosfoglicoproteína transmembranar, pode ser expresso em células progenitoras

hematopoiéticas, células tronco, endoteliais e dendríticas . Faz parte da subfamília das sialomucinas possui o peso molecular de 115 kDa e sua estrutura é formada por um domínio extracelular que é glicosilado que pode regular a adesão celular e um domínio citoplasmático com sítio de fosforilação capaz de interagir com proteínas intracelulares. As funções dessa proteína ainda não foram esclarecidas, porém foi sugerido que podem aumentar ou bloquear a diferenciação das células progenitoras e promover a adesão dos linfócitos ao endotélio ^{78, 79, 80}. As MVs-CD34+ já foram descritas como um potencial biomarcador clínico para diferentes doenças como na Leucemia Mieloide Crônica ⁸¹, esclerose sistêmica ⁸² e hepatite ⁸³.

O CD13 também chamado de Aminopeptidase N, é uma ectopeptidase transmembranar formada por 967 aminoácidos e dividida em três regiões: um N-terminal no citoplasma, um domínio transmembranar de hélice e uma região extracelular ⁸⁴. O CD13 é altamente expresso em células mieloides e endoteliais, participa de diversos processos como na adesão e motilidade celular, pode atuar como uma molécula de adesão inflamatória, regular a migração de células endoteliais e regular a angiogênese ^{85,86}. As microvesículas derivadas de células mieloides positivas para CD13 já foram descritas em quantidades elevadas na síndrome da resposta inflamatória sistêmica e se correlacionavam com a gravidade da doença ⁸⁷.

O CD33 ou Siglec-3 é um receptor de membrana da família das lectinas expresso em células progenitoras mieloides, monócitos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas e microglia cerebral ⁸⁸. O CD117 também chamado de c-KIT ou receptor do fator de crescimento de mastócitos/células-tronco, é um receptor tirosina quinase do tipo III presente em células progenitoras da linhagem mielóide, células-tronco e outras células que atua na proliferação e diferenciação celular ⁸⁹. Um estudo mostrou que pacientes com Leucemia Mieloide Aguda apresentavam populações de microvesículas positivas para os marcadores CD33, CD34 e CD117 e que essas MVs tinham a capacidade de suprimir a atividade das células NK ⁹⁰.

- **Microvesículas derivadas das células do sistema imune**

As microvesículas derivadas de leucócitos (MVs-L) podem atuar de forma imunoativadora ou imunoinibidora, a forma como vão agir no organismo depende de qual foi a célula secretora, de fatores ambientais, como de interações receptor-ligante e lectinas mitogênicas. Um exemplo desse processo é que as células T e B liberam MVs após a ativação de receptores presentes na

superfície celular, enquanto as células dendríticas e os macrófagos secretam constitutivamente MVs, sendo assim a liberação é modulada por fatores do microambiente externo e está associado também ao tipo celular ⁹¹.

Todas as células-tronco hematopoiéticas com exceção dos eritrócitos e plaquetas expressam o marcador CD45, ele representa cerca de 10% dos antígenos nessas células e por esse motivo é uma boa escolha para identificar os leucócitos. O CD45 é uma proteína tirosina fosfatase transmembrana do tipo I com 180-220 kDa. Possui dois domínios citoplasmático constituídos de proteínas tirosinas fosfatases, um domínio transmembrana e um domínio extracelular grande e fortemente glicosilado. O *splicing* alternativo^{1 92} permite que o CD45 possua várias isoformas e sua expressão é organizada de forma específica a cada estágio de desenvolvimento da célula. Apesar de ser fortemente expressa nas células sua função não foi esclarecida ^{93,94}.

As células dendríticas contribuem para o início da resposta imune e mobilizam células progenitoras e células T ⁹⁵. O CD11c também chamado de Itgax, expresso em células dendríticas é um receptor de adesão da família de integrinas $\beta 2$ ⁹⁶.

Os monócitos são células fagocitárias responsáveis por atuar na defesa do organismo fagocitando patógenos, na homeostase e no reparo tecidual. As populações de monócitos podem ser identificadas pelo marcador CD14 ⁹⁷.

O CD14 é altamente expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos e é encontrado em forma solúvel no soro, cerebrospinal e outros fluidos corporais. O CD14 é uma glicoproteína de 55 Kda ancorada em GPI, um receptor do sistema imune inato que sensibiliza as células na presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos gram-negativos, ativando o receptor Toll-like 4 (TLR4) que inicia a resposta no organismo que leva ao processo de inflamação que produz citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão levando conseqüentemente a eliminação das bactérias ⁹⁸.

Os neutrófilos atuam no sistema imune como fagócitos de patógenos de células estranhas e possuem grânulos que liberam enzimas que facilitam o processo de fagocitose. O CD66b é armazenado nos grânulos dos neutrófilos e após a ativação e conseqüentemente a degranulação o CD66b é expresso na superfície da célula, por esse motivo é considerado um marcador de ativação para os granulócitos. O CD66b pode ser denominado também por outros nomes como

¹ O *splicing* alternativo é um processo que permite que um único gene codifique várias proteínas ou isoformas únicas, por meio da variação na região de ligação dos éxons e íntrons. Rahhal R, Seto E. Emerging roles of histone modifications and HDACs in RNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jun 4; 47(10): 4911–4926.

Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 8 (CEACAM8) e antígeno inespecífico de reação cruzada (NCA-95). É uma glicoproteína que pertence a família das Ig das Ag carcinoembrionário humano (CEA). As funções do CD66b ainda não são totalmente esclarecidas, mas acredita-se que facilita a adesão dos neutrófilos à e-selectina no endotélio mediado pelo CD15, um ligante da e-selectina que está presente na molécula CD66^{99,100,101}.

O CD16 também chamado de Fc γ RIII é um receptor para imunoglobulina G (IgG) (Fc γ Rs), está presente nos neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos e células NK e sua principal função é inativar células estranhas. O CD16 é crucial para resposta imune humoral e possui esta capacidade pois consegue interagir com os IgG e transmitir os sinais de ativação através das tirosinas imunoreceptoras da região citoplasmática, participar da endocitose e da fagocitose de imunocomplexos e de microorganismos opsonizados por anticorpos^{102, 103}.

Os linfócitos T desempenham um papel fundamental no sistema imune, podem atuar como reguladoras, citotóxicas ou auxiliares. O CD3 é um componente na formação do complexo receptor de células T (TCR) e apresenta um domínio Ig extracelular transmembrana com uma cauda citoplasmática que possibilita a transdução de sinais, contribui na entrega de sinalizações imprescindíveis para as células T já que o TCR-CD3 é um receptor transmembrana necessário para o desenvolvimento e diferenciação da célula e para a indução de respostas imunes contra patógenos^{104, 105, 106}. Por esse motivo o complexo CD3 é uma molécula alvo para identificação das células T. Os principais grupos de células T podem ser divididos em CD3+ CD8+ que são citotóxicos e CD3+ CD4+ que possuem funções pró e anti-inflamatórias¹⁰⁷.

As células B atuam no sistema imune adaptativo, um marcador celular confiável para identificação dessas células é o CD19 uma glicoproteína com 94 kd, transmembrana tipo I da família das imunoglobulinas (Ig), que possui um domínio transmembrana, um terminal C citoplasmático e um terminal N extracelular. O CD19 atua na ativação das células B induzida por Ig e junto com o receptor de células B (BCR) e outras moléculas recruta de forma direta e indireta várias proteínas quinases¹⁰⁸.

O CD19 é expresso desde os estágios iniciais até os processos finais de maturação das células B, também é expresso em leucemias e em alguns linfomas, porém não é expresso em plasmócitos e células-tronco hematopoiéticas^{109, 110}.

As células NK possuem a função de eliminar células tumorais ou infectadas por meio da liberação de citocinas que matam as células alvo. A célula NK podem ser identificadas pela

presença do CD56 . O CD56 também é chamado de molécula de adesão de células neurais (NCAM) e está presente na superfície da célula NK auxiliando no controle de seus movimentos e na manutenção do ambiente. NCAM pertence à família das imunoglobulinas de moléculas de adesão celular e graças ao *splicing*² de RNA¹¹¹ apresenta diversas isoformas. O NCAM também é expresso em células neurais, no coração, rins, músculos esqueléticos, fígado e células dendríticas e possui um importante papel não somente no sistema imune mais também na diferenciação celular e na plasticidade sináptica^{112,113}.

- **Microvesículas derivadas de plaquetas**

As microvesículas derivadas de plaquetas (MVs-P) são a população circulantes de MVs mais abundante no organismo descritas na literatura. Os estímulos para liberação das MVs-P são variados, como por exemplo, pode ser uma resposta ao estresse de cisalhamento, a trombina, ao ionóforo de cálcio, ao ADP, ao colágeno e ao peptídeo relacionado ao colágeno. Por causa dessa grande variedade de estímulos que levam a liberação das MVs-P existe grandes quantidades delas circulantes no organismo e o seu conteúdo também é diversificado pois depende de qual foi o estímulo de liberação¹⁵.

Os marcadores de superfícies das MVs-P são o CD41 (subunidade α IIb-integrina), e CD42b (GPIb). O CD41a ou complexo GPIIb/IIIa é um receptor de membrana dependente de cálcio que é expresso em plaquetas e megacariócitos, esse complexo tem como função agir como um receptor de fibrinogênio e de fator de von Willebrand (FVW), além de auxiliar na adesão e agregação plaquetária¹¹⁴.

O papel das MVs-P na inflamação é importantíssimo pois podem interagir com as células envolvidas na inflamação, carregar citocinas, ativar as reações inflamatórias, ativar células imunes e do endotélio, intensificar a migração transendotelial de leucócitos, estimular a quimiotaxia e reduzir a apoptose das células inflamatórias¹¹⁵.

² Os genes possuem dois tipos de sequências os éxons (codificantes) e os íntrons (não codificantes). Durante a produção do mRNA os íntrons são retirados por um processo denominado “splicing de RNA” que origina o mRNA maduro com apenas as sequências codificantes. Majerciak V, Zheng Z. Detection of Viral RNA Splicing in Diagnostic Virology. Springer International Publishing . 2018. 345-402

- **Microvesículas derivadas de eritrócitos**

As microvesículas liberadas por eritrócitos (MVs-E) são um mecanismo essencial para homeostase das hemácias. As MVs-E podem transportar hemoglobina e são capazes de se ligar ao óxido nítrico e modificar a biodisponibilidade dele na homeostase vascular. Essas MVs-E podem também proteger as hemácias de duas formas: prolongando o tempo de vida das hemácias evitando a eliminação prematura, por meio do transporte de moléculas que induzem o reconhecimento pelo sistema reticuloendotelial, como hemoglobina não funcional, banda 3 oxidada e agregada e proteínas oxidadas, ou impedindo a eliminação pelos macrófagos. Podem desempenhar um papel na resposta imunológica à infecções estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos e a liberação rápida dessas espécies de oxigênio permitindo uma resposta imunológica mais rápida ¹¹⁶.

Os eritrócitos têm em sua membrana o marcador CD235a também chamado de glicoforina A (GPA) que é específico de células da linhagem eritroide como: proeritroblasto, eritroblasto basofílico, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulócitos e eritrócitos. O CD235a é uma sialoglicoproteína transmembrana do tipo I e possui o peso de 20-30 kDa, sua função molecular não está esclarecida, porém sabe-se que existe uma interação entre a glicoforina A com a banda 3 ^{117, 118, 119}.

- **Microvesículas derivadas de células endoteliais**

As microvesículas liberadas por células endoteliais (MVs-CE) podem atuar na fisiologia, na patogênese e na progressão de diversas doenças, exercendo funções autócrinas ou parácrinas. Em processos patológicos são encontradas altas concentrações de MVs-CE que são capazes de ocasionar efeitos deletérios nas células alvos. Um exemplo da ação das MVs-CE pode ser encontrado principalmente em doenças vasculares agudas ou crônicas, onde podem levar a uma lesão vascular e ativar as células endoteliais dificultando o vasorrelaxamento e promovendo a rigidez arterial e MVs-CE positivas para fosfatidilserina e o fator tecidual podem agir também nos processos de coagulação e trombose. Tendo em vista a ação das MVs-CE é possível utilizá-las como um biomarcador de disfunção endotelial e trombose ^{120, 121}.

As MVs-CE podem ser identificadas pelo marcador CD51/61 que é um complexo também chamado de $\alpha V\beta 3$, esse nome faz referência as duas integrinas que compõe esse complexo a integrina alfa v e a integrina beta 3. As integrinas são receptores transmembrana e as subunidades estão conectadas de forma não covalente. O CD51 é um heterodímero composto por proteínas de membrana com 125 kD e 24 kD que estão conectadas por dissulfeto, compostas por um domínio extracelular, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático. O CD61 é composto por uma proteína com 110 kD ^{122, 123, 124}.

O complexo CD51/61 é expresso em osteoclastos, células endoteliais, células de melanoma, plaquetas e macrófagos. Esse complexo se liga a várias proteínas como as fibronectinas, fibrinogênio, fator de von Willebrand, lamininas, trombospondinas e a molécula de adesão neural L1. Desempenha diversas funções como interações célula-célula com auxílio do CD31, regula interações da célula com os componentes da matriz, desempenha um papel no homing e rolamento de leucócitos e na angiogênese ^{125, 126}.

Os marcadores e suas funções estão representados na figura 8 e a figura 9 representa como as microvesículas agem na patogênese das NMP.

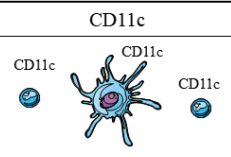
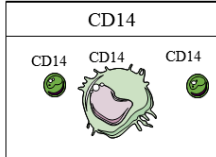
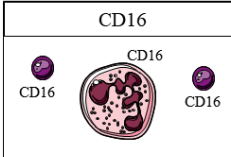
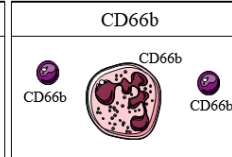
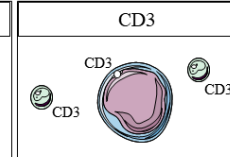
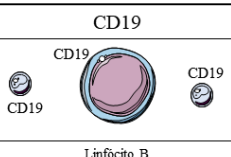
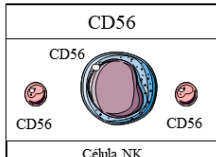
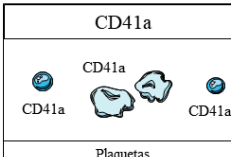
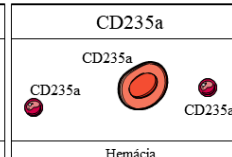
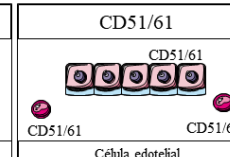
| | | | | |
|--|---|--|--|---|
|  <p>CD11c</p> |  <p>CD14</p> |  <p>CD16</p> |  <p>CD66b</p> |  <p>CD3</p> |
| Célula dendrítica | Monócito | Neutrófilo | Neutrófilo | Linfócito T |
| Função: também chamado de Itgax, receptor de adesão da família de integrinas | Função: sensibiliza as células, ativando o TLR4 que inicia a resposta no organismo que leva a eliminação das bactérias | Função: participa da endocitose e da fagocitose de imunocomplexos e de microorganismos opsonizados por anticorpos | Função: facilita a adesão dos neutrófilos à E-selectina no endotélio | Função: necessário para o desenvolvimento e diferenciação da célula e para a indução de respostas imunes contra patógenos |
|  <p>CD19</p> |  <p>CD56</p> |  <p>CD41a</p> |  <p>CD235a</p> |  <p>CD51/61</p> |
| Linfócito B | Célula NK | Plaquetas | Hemácia | Célula edotelial |
| Função: ativa as células B e recruta várias proteínas quinases | Função: Atua no sistema imune, na diferenciação celular e na plasticidade sináptica. | Função: receptor de fibrinogênio e de fator de von Willebrand (vWF) e auxiliar na adesão e agregação plaquetária | Função: função molecular não está esclarecida porém existe uma interação entre a GPA com a banda 3. | Função: Interações da célula com os componentes da matriz, desempenham um papel no homing e rolamento de leucócitos e na angiogênese |

Figura 8. Marcadores celulares e suas funções.

Fonte: Autoria própria.

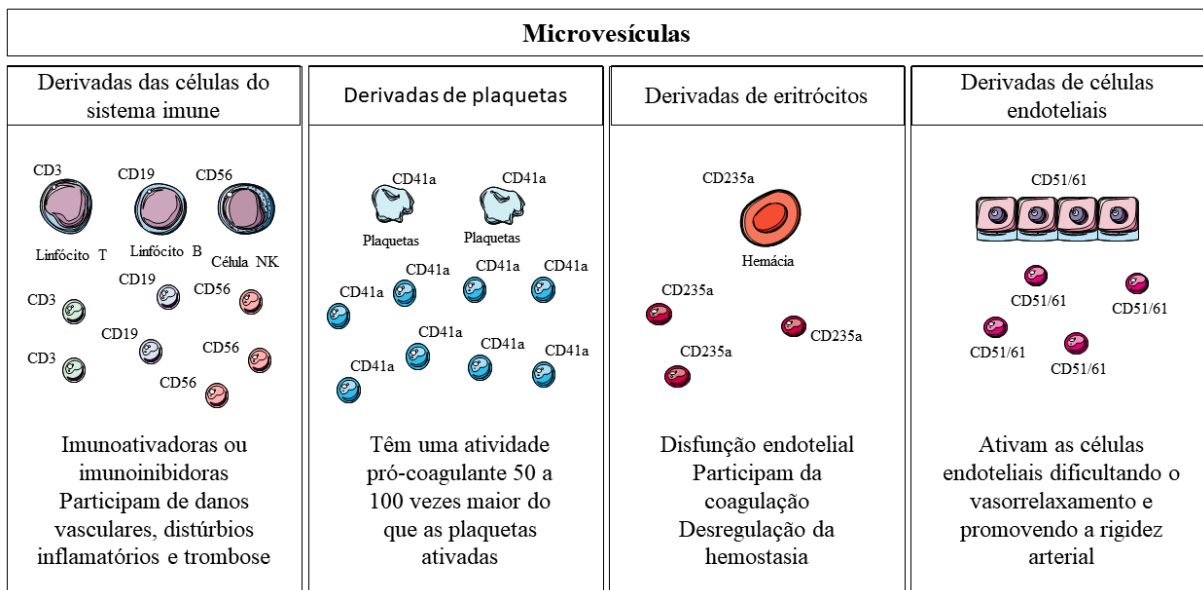


Figura 9. Atuação das microvesículas no organismo.

Fonte: Autoria própria.

1.6.4. Microvesículas na Trombocitemia Essencial

As microvesículas possuem a capacidade de transmitir informações intercelular e assim coordenar a sinergia entre as células e atuar em vários processos como renovação e diferenciação de células-troncos, reparo tecidual, vigilância imunológica e coagulação sanguínea, estando presentes não apenas em processos fisiológicos como em processos patológicos ¹²⁷.

As microvesículas já foram associadas ao desenvolvimento de diversas patologias, acredita-se que as MVs são grandes promotoras do câncer no organismo, as células cancerosas liberam mais MVs do que células saudáveis e em seu conteúdo carregam proteínas e ácidos nucleicos derivados dessas células malignas, que podem ser transferidos a células saudáveis alterando seu comportamento ou fenótipo, aumentando a capacidade de metástase deste câncer. As MVs podem controlar o microambiente para favorecer a progressão do câncer e evitar que essas células sejam eliminadas pelo sistema imunológico ^{10, 128}.

Acredita-se que as microvesículas possa ser um biomarcador indicador de risco de trombose em pacientes com Trombocitemia Essencial, pois as MVs possuem capacidades pró-

coagulantes, essa função está associada aos antígenos em sua superfície o fator tecidual e a fosfatidilserina ¹²⁹.

As MVs liberadas em processos fisiológicos também apresentam o FS em sua superfície, porém na parte interna da membrana e só é transportado ao exterior da membrana quando é necessário, como por exemplo, em caso de lesão vascular, porém as MVs liberadas por células neoplásicas possuem o FS externalizado e promovem o processo de coagulação. A fosfatidilserina facilita o processo de fusão da membrana, transferência de cargas entre as células e tem a capacidade de favorecer a coagulação, agindo como uma região de ativação de complexos, como a protrombinase e tenase, indiretamente aumentando a capacidade de coagulação e podendo ocasionar eventos trombóticos. A quantificação das MVs circulantes nos pacientes com TE poderia então indicar um estado pró-trombótico ^{16, 130}.

Trappenburg e colaboradores, realizaram um dos primeiros estudos a avaliar as microvesículas circulantes em pacientes com TE e constataram que o número de MVs liberadas por pacientes com TE com os marcadores CD41, CD61, CD62E, CD66b, CD54 e CD14 eram maiores que em indivíduos sem a neoplasia. As MVs encontradas nos pacientes eram derivadas de plaquetas e células endoteliais e 90% dessas MVs se ligaram a anexina-V, portanto tinham a fosfatidilserina. Um alto nível de MVs-P foi encontrado nos pacientes com fatores de risco para trombose e os pacientes com MVs-CE apresentaram uma ativação endotelial crônica com um nível elevado de FVW maduro na presença de um nível relativamente baixo de propeptídeo ¹³¹.

Marchetti et al. encontraram uma associação entre a presença de MVs circulantes em pacientes com TE e atividade pró-coagulante. Para estabelecer esta associação as MVs foram removidas por meio da centrifugação do plasma e foi avaliado a geração de trombina e atividade pró-coagulante fosfolipídica plasmática. A remoção das MVs levou a redução de 85% da capacidade de geração de trombina e uma redução de 25% na atividade pró coagulante. Não foi encontrado diferença entre o grupo com trombose e sem trombose, porém os pacientes com a variante genética *JAK2V617F* exibiram em todos os parâmetros das curvas de geração de trombina um potencial pró-coagulante maior do que pacientes sem a variante e os controles ¹³².

Outro estudo realizado Charpentier et al, mostrou que pacientes com a variante *JAK2V617F* possuíam maiores níveis de MVs circulantes derivadas de eritrócitos e plaquetas, do que os pacientes com a variante no gene *CALR* (tipo 1, 52-pb deleção e tipo 2, 5-pb inserção) e os pacientes triplo negativos ¹³⁰.

Zhang W et al, identificaram que os pacientes com TE tinham níveis elevados de microvesículas derivadas de eritrócitos, plaquetas, células endoteliais e MVs com fator tecidual em sua superfície. Os pacientes que apresentaram os maiores índices de MVs-P, MVs-E e MVs-CE estavam nos grupos com trombose, esplenomegalia ou positivos para variante *JAK2V617F*¹³³.

No estudo realizado por Aswad et al, a presença da variante *JAK2V617F* também foi associada a concentrações mais altas de MVs-P. Esses pacientes apresentavam não só altos níveis de MVs-P, como, de MVs-E também, mas não foi possível estabelecer uma relação entre as MVs-E e *JAK2V617F*+, porém foi encontrado uma associação com os exames laboratoriais como hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas, hemácias e leucócitos e um nível elevado de MVs. Esses resultados indicam que é necessária uma prevenção para que esses parâmetros se mantenham dentro dos limites recomendados, já que o aumento deles está associado ao aumento das MVs circulantes que podem ocasionar processos patológicos, como por exemplo, trombose. Os pacientes no grupo de risco de desenvolver trombose foram com a idade ≥ 60 anos, histórico de trombose, com a variante genética *JAK2V617F*, tabagismo e do sexo masculino¹²⁹.

Piccin et al. mostraram que o tratamento com anagrelida diminui a quantidade de MVs circulante de origem plaquetária, demonstrando a importância do tratamento frente o perfil de microvesículas e as possíveis relações com os eventos trombóticos¹³⁴. A ação das microvesículas na Trombocitemia Essencial está representada na figura 10.

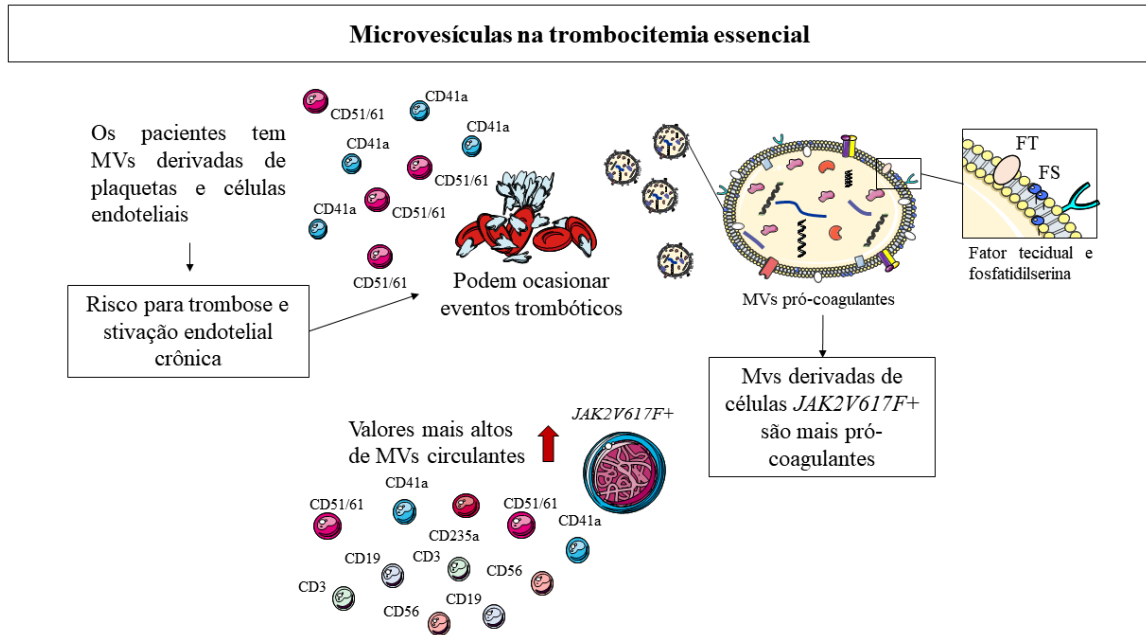


Figura 10. Microvesículas na Trombocitemia Essencial.

Fonte: Autoria própria.

Em alguns casos é difícil estabelecer o diagnóstico da trombocitemia essencial nos estágios iniciais da neoplasia, porém o diagnóstico correto e monitoramento contínuo da doença são essenciais para o tratamento da doença. A biópsia líquida por ser uma técnica menos invasiva, rápida e indolor e levanta a possibilidade de identificar biomarcadores que poderiam ser utilizados não apenas como forma complementar ao diagnóstico, como também no monitoramento da doença, estratificação de risco e auxiliar na escolha de tratamento ¹³⁵.

As MVs possuem os mesmos receptores da célula de origem e podem ser avaliadas pelos mesmos parâmetros, possuindo ainda a vantagem de ser encontradas em todos os fluidos corporais de forma abundante facilitando a coleta e análise das mesmas em comparação com as técnicas baseadas em células ¹⁶.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar o perfil das microvesículas circulantes em pacientes com diagnóstico de Trombocitemia Essencial atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Descrever as características epidemiológicas e clínico-laboratorial dos pacientes com Trombocitemia Essencial atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas;
- 2.2.2. Avaliar o perfil de microvesículas circulantes derivadas de leucócitos inflamatórios (linfócitos, monócitos e neutrófilos), eritrócitos, plaquetas e células endoteliais em grupos de indivíduos saudáveis e pacientes com Trombocitemia Essencial;
- 2.2.3. Investigar a correlação das populações de microvesículas circulantes com as características clínico-laboratoriais de pacientes com Trombocitemia Essencial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo

O estudo proposto é do tipo descritivo-correlacional transversal.

3.2. Área de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Manaus-Amazonas, desenvolvido no Laboratório Multidisciplinar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) em parceria com Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-MG) localizado em Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.3. População de Estudo

A população de estudo foi composta de indivíduos que foram atendidos espontaneamente na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), com diagnóstico clínico da neoplasia Trombocitemia essencial (TE:D47.3), no período agosto de 2021 a novembro de 2022. Além dos pacientes, foram recrutados indivíduos, negativos para doenças infecciosas e aptos para doar sangue da Fundação HEMOAM, para participarem do grupo controle.

3.4. Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico clínico de Trombocitemia Essencial (CID:47.3) sob uso ou não de terapia citorrredutora; de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, com disponibilidade de acesso aos prontuários para caracterização clínica e laboratorial da doença, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação na pesquisa.

Não foram incluídos pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásico, pacientes grávidas, com diagnóstico de síndromes mieloproliferativas BCR::ABL1 Negativo diferentes de TE e pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Foram excluídos pacientes cujas amostras apresentaram quantidades insuficientes para análise, amostras coaguladas e pacientes que não apresentaram dados nos prontuários suficientes para caracterização clínica e laboratorial da doença.

3.5. Aspectos éticos

O projeto pertence a um projeto maior intitulado “Caracterização Molecular de Pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas” e foi executado de acordo as normativas estabelecidas na resolução 466/12 Processo com número de parecer aprovado: 4.450.813. CAAE: 39991420.6.0000.0009, coordenado pela Dra. Andréa Tarragô.

Para a obtenção das amostras de doadores de sangue foram utilizadas amostras provenientes do projeto “Caracterização de microvesículas e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.” que foi executado de acordo as normativas estabelecidas na resolução 466/12 Processo com número de parecer aprovado: 5.520.298. CAAE: 48463121.3.0000.0009, coordenado pela Dra. Andrea Tarragô.

3.6. Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Foram avaliados os prontuários dos pacientes para coleta das características sociodemográficas e clínicas: sexo, idade ao diagnóstico, presença de esplenomegalia, manifestação de eventos trombóticos ou hemorrágicos e tratamento utilizado.

As amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas por punção venosa em oito tubos com sistema a vácuo. Foram usados quatro tubos para alíquotagem e armazenamento, três tubos para realização de exames laboratoriais e um tubo para análise molecular.

Quatro tubos foram encaminhados para laboratório multidisciplinar da Fundação HEMOAM, para centrifugar e alíquotar em criotubos previamente identificados com o código do projeto maior. Dois tubos de EDTA tiveram seus conteúdos diretamente transferidos para os microtubos. Um tubo contendo gel separador de soro foi centrifugado a 1900 ×g por 5

minutos e o sobrenadante foi transferido para o criotubo. Um tubo com citrato de sódio 3,2% centrifugado a 400 ×g por 15 minutos, posteriormente o sobrenadante / Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi transferido para os criotubos e armazenados no laboratório de genômica da Fundação HEMOAM, em freezer -80°C.

Foram utilizados três tubos para exames laboratoriais e um para análises moleculares, da seguinte forma um tubo contendo gel separador de soro (BD Vacutainer® SST II ativador) para determinações bioquímicas, um tubo com citrato de sódio ao 3,2% para testes hemostáticos, um tubo com ácido etilenodiamino tetracético - EDTA- (BD Vacutainer® EDTA K2) para determinação de parâmetros hematológicos e um tubo com EDTA foi utilizado para as análises moleculares.

Para obtenção das amostras biológicas do grupo controle realizamos uma punção venosa, em sete tubos, sendo quatro tubos de 4 ml de sangue periférico contendo anticoagulante citrato de sódio, dois tubos de 4 ml contendo EDTA e um tubo com gel separador. Não foi realizado análise molecular por esse motivo coletamos um tubo de EDTA a menos.

O processamento e armazenamento das amostras controle realizamos seguindo o mesmo protocolo das amostras da população de estudo.

3.7. Testes da avaliação da hemostasia

As amostras coletadas no tubo com citrato de sódio centrifugamos por 15 min a 600 ×g. Com o plasma obtido foi avaliado o perfil hemostático, com a finalidade de determinar se a risco hemorrágico ou trombótico. Os testes realizados foram Tempo de Atividade da Protombina (TAP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa). Para avaliação destes parâmetros foi utilizado o equipamento da STAGO (Stago Brasil Comércio, Importação e Exportação de produtos Diagnósticos Ltda, São Paulo, Brasil).

3.8. Análises Bioquímicas

As amostras coletadas no tubo com gel separador foram centrifugadas por 10 min a 400×g para a avaliação de Lactato Deshidrogenase (LDH) e Ácido Úrico. Para determinações

bioquímicas foi utilizado o analisador COBAS INTEGRA 400 plus (Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo, Brasil).

3.9. Análises Hematológicas

As amostras coletadas no tubo com EDTA foram utilizadas para avaliação de parâmetros hematológicos, através da Contagem de hemácias (RBC), Hemoglobina (HBA), Hematócrito (HTO), Contagem de Leucócitos (WBC), Contagem de Plaquetas (PLT), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), neutrófilos segmentados (%), Eosinófilos (%), Basófilos (%), Linfócitos (%) e Monócitos (%). Para avaliação destes parâmetros foi utilizado o analisador hematológico SYSMEX-XN (Sysmex do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Curitiba, Brasil).

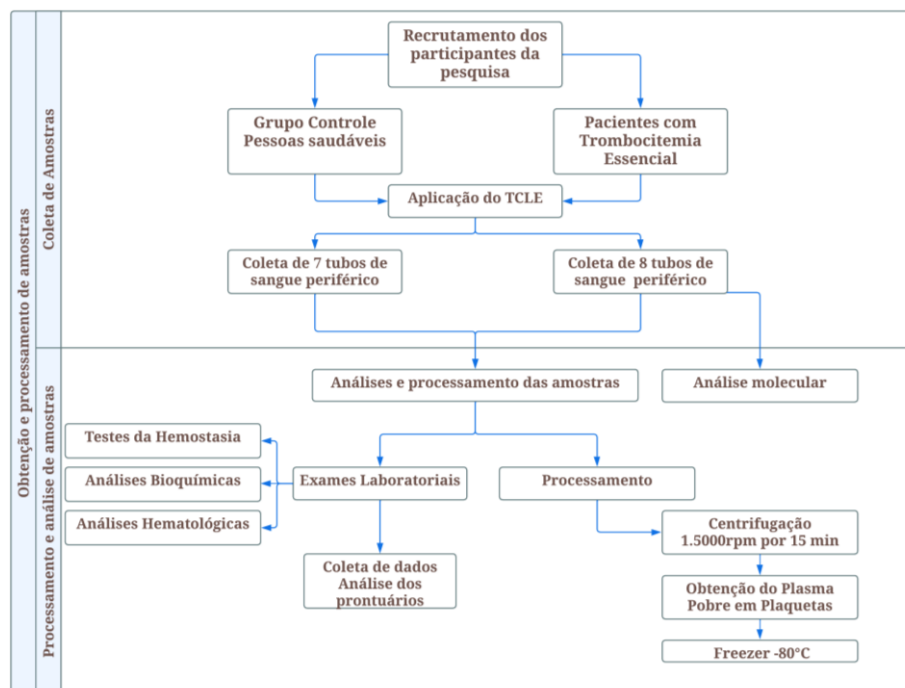


Figura 11. Fluxograma de obtenção e processamento das amostras. Demonstração detalhada das etapas de coleta e processamento das amostras utilizadas no estudo.

Fonte: Autoria própria.

3.10. Imunofenotipagem de Microvesículas

Determinamos a quantidade e fenótipo das MVs no plasma citratado por citometria de fluxo seguindo o método padronizado pelo Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB), Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas.

Obtivemos o Plasma Livre de Plaquetas (PLP), inicialmente descongelando as amostras de sobrenadante / PPP em banho-maria a 36°C e aliquotando 700 µl em tubos tipo eppendorf e centrifugando a 21475 ×g por 10 minutos a 18°C com aceleração 9 e desaceleração 0.

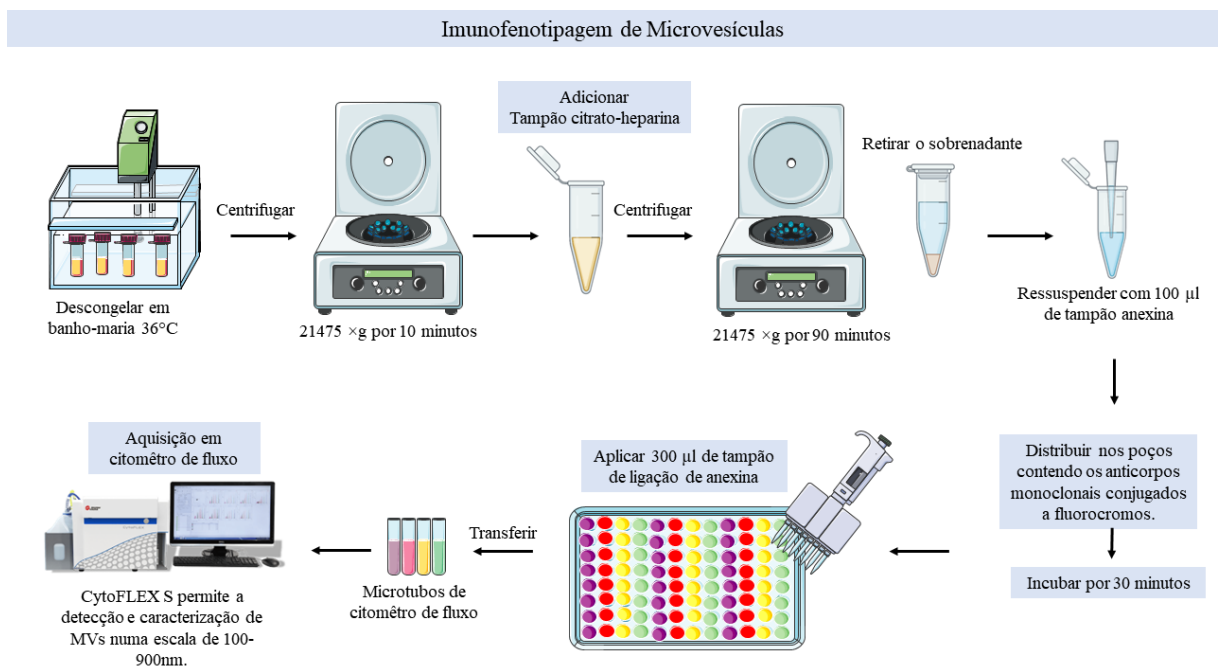
Preparamos 6 tubos eppendorf por amostra e adicionamos 300 µl de tampão citrato-heparina e após a primeira centrifugação das amostras transferimos 100 µl de amostra para cada tubo com tampão e centrifugamos a 21475 ×g por 90 min a 18°C. Durante esse período preparamos a placa e pipetamos 2 µl anticorpos (com exceção do CD235 que pipetamos apenas 1 µl) em seus devidos poços e 2 µl Anexina V em todos os poços onde irão as amostras.

Após a segunda centrifugação retiramos o sobrenadante e ressuspendemos o pellet com 100 µl de tampão anexina, distribuímos nos poços (placa) contendo os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se ligaram aos marcadores de superfície específicos presentes nas populações de MVs (quadro 3), e incubamos por 30 minutos ao abrigo de luz em temperatura ambiente. Após a incubação, aplicamos 300 µl de tampão de ligação de anexina nos poços, transferimos o conteúdo para os microtubos de citometria de fluxo, o conteúdo final foi 400 µl e por fim adicionamos 400 µl de tampão anexina nos controles e transferimos para os microtubos de citometria.

As amostras foram analisadas no citômetro por 2 minutos cada amostra. A aquisição das amostras foi feita com o citometro de fluxo CytoFLEX S (Beckman Coulter), equipamento altamente sensível que permite a detecção e caracterização de MVs numa escala de 100-900nm através da utilização de microesferas sintéticas de calibração denominadas Gigamix. Estas microesferas possuem tamanhos definidos (100nm; 160nm; 200nm; 240nm; 300nm; 500nm; 900nm) servindo como referência para caracterização de MVs. Podendo ser adquiridos 500.000 MVs/amostra. Os resultados expressos em frequência e número de MVs/uL de amostra biológica. O processo de imunofenotipagem de microvesículas está exemplificado na figura 12.

Quadro 3. Pannel para imunofenotipagem das populações de MVs.

| Tubo | MVS | FITC | PE | Efluor450 | PerCP | PE-Cy5 | PE-Cy7 | APC |
|------|--|--------|-----------|-----------|-------|--------|--------|------|
| 1 | Controle (Anexina V) | Anex V | - | - | - | - | - | - |
| 2 | Granulócitos / células mieloide | Anex V | CD66b | - | - | CD56 | CD13 | CD45 |
| 3 | Cel. Endoteliais / eritrócitos | Anex V | CD51/CD61 | - | - | CD235a | - | - |
| 4 | Células T / plaquetas/ células B | Anex V | CD3 | - | CD41a | - | - | CD19 |
| 5 | Neutrófilos/ monócitos/ Cel. Dendríticas | Anex V | CD16 | - | CD14 | CD11c | - | - |
| 6 | Células progenitoras/ mielóide | Anex V | CD34 | CD117 | - | - | - | CD33 |

**Figura 12.** Fluxograma da imunofenotipagem das microvesículas.

Fonte: Autoria própria.

3.11. Análise estatística

As características clínicas e laboratoriais dos indivíduos estudados foram apresentadas em formas de tabelas e gráficos, elaboradas com o programa Excel 2013 (Microsoft Office 365). Os resultados obtidos na imunofenotipagem foram analisados através do software FlowJo (v.10). Para elaboração das análises estatísticas convencionais utilizamos o software GraphPad Prism (v.9.0.1).

Verificamos a normalidade dos dados com o teste Shapiro Wilk para cada variável. Comparamos os valores entre dois grupos através do teste de Mann-Whitney, enquanto para a comparação das variáveis com três grupos, aplicamos o teste de Kruskal-Wallis. Os níveis de significância estatística definidos para todos os testes foi de $p < 0,05$.

A construção das matrizes de correlações, foram elaboradas no programa Excel (Microsoft Office 365), as associações entre os níveis quantitativos das microvesículas foram constituídas utilizando o coeficiente dos valores do teste de correlação de Spearman e as correlações selecionadas foram as que apresentaram um valor estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil de microvesículas circulantes em pacientes com trombocitemia essencial em uso de hidroxiureia

Artigo original a ser submetido em revista A1

PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES EM PACIENTES COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL EM USO DE HIDROXIUREIA

Emanuela Vitória Barbosa Alves^{1,2}, Miliane Araújo de Sousa^{1,2}, Iandara Maíra Lopes de Souza^{1,2}, Dania G. Torres^{1,3}, Jhemerson Fernandes Paes^{1,2}, Deborah Canté de Aquino^{1,2}, Erycka Alves de Mesquita^{1,2}, Bruno Eduardo Feitosa do Nascimento², Wanessa Horreda Laranjeira^{1,2}, Marina Malheiros Araújo Silvestrini⁴, Armanda Barbosa⁴, Adriana Malheiro^{1,2,5}, Rosangela Santos de Abreu^{1,2}, Cristina Mesquita^{1,2}, Nelson Abrahim Fraiji^{1,2}, Suely Meireles Rezende^{1,6}, George Allan Villarouco da Silva^{1,7}, Andréa Teixeira-Carvalho^{1,4,8}, Olindo Assis Martins Filho^{1,4,8}, Allyson Guimarães da Costa^{1,2,5,9,10}, Lucivana Prata de Souza Mourão^{1,11} e Andréa Monteiro Tarragô^{1,2,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil

² Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brasil

³ Centro de Biologia Molecular, Universidad Centroamerica, Managua-Nicaragua 14101

⁴ Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou-FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Brasil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brasil

⁶ Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

⁷ Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Amazônia), Manaus, Brasil

⁸ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brasil

⁹ Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brasil

¹⁰ Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Brasil

¹¹ Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil

* Correspondência para: Andrea M. Tarragô, PhD, ORCID: 0000-0003-3125-580X

andrea_s_monteiro@hotmail.com

RESUMO

A trombocitemia essencial é uma neoplasia mieloproliferativa onde ocorre a proliferação exacerbada de megacariócitos e trombocitose no sangue periférico. A hidroxiureia é um citorredutor indicado como tratamento de primeira linha para essa patologia. As microvesículas (MVs) são liberadas por diversos tipos de células e atuam no transporte de cargas capazes de alterar o fenótipo e comportamento das células, na sinalização intercelular, na evasão imune e na modulação do microambiente, favorecendo processos inflamatórios e trombóticos. Com o propósito de compreender o papel das Mvs na fisiopatologia da TE o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil das microvesículas circulantes em pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial que estão fazendo uso de hidroxiureia. Foram incluídos 76 indivíduos no grupo de estudo, sendo 38 pacientes com diagnóstico confirmado de trombocitemia essencial e 38 indivíduos para o grupo controle. As análises das amostras foram realizadas por citometria de fluxo. O grupo com TE apresentou o maior número de MVs totais e dos marcadores: CD34, CD13, CD11c, CD14, CD16, CD66b, CD3, CD19, CD56 e CD235a. Nosso estudo comprovou que diversas populações de MVs podem estar envolvidas na patogênese da TE e que mesmo após o tratamento o nível de MVs circulantes continua elevado. Também foi possível encontrar uma associação entre a diminuição do número total de MVs com o aumento do tempo de tratamento.

1. INTRODUÇÃO

A trombocitemia essencial é uma neoplasia mieloproliferativa caracterizada pelo aumento do número de megacariócitos maduros na medula óssea e uma acentuada trombocitose no sangue periférico ¹. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima uma incidência de 1,5–2,0 casos por 100.000 habitantes por ano, com maior prevalência no sexo feminino durante a idade de 50 a 55 anos ².

O desenvolvimento da TE é complexo e depende de um microambiente favorável, que inclui a comunicação de diversas células e liberação de citocinas. Esse microambiente garante a sobrevivência das células neoplásicas, evasão imune e está associado ao quadro de inflamação crônica encontrados nesses pacientes ^{3,4}.

Nesse contexto, as microvesículas (MVs) atuam na comunicação intercelular, são formadas por brotamento de membrana e possuem o tamanho de 100 a 1000 nm ^{5,6,7}. Podem ser liberadas por todos os tipos de células, com um conteúdo diversificado que se altera dependendo do estímulo recebido, são secretadas de forma exacerbada durante processos patológicos e estão presente em praticamente todos os fluidos corporais, portanto a caracterização das MVs se torna imprescindível para melhor entendimento da patogênese das doenças ^{8,9}.

As microvesículas estão presentes no desenvolvimento de diversas patologias, são grandes promotoras do câncer no organismo, as células cancerosas liberam mais MVs do que células saudáveis e carregam conteúdos como proteínas e ácidos nucleicos derivados dessas células

malignas que podem ser transferidos a células saudáveis alterando seu comportamento celular/molecular ou fenótipo, aumentando a capacidade de metástase deste câncer. Além disso as MVs podem controlar o microambiente para favorecer a progressão do câncer e evitar que essas células sejam eliminadas pelo sistema imunológico^{10, 11}.

Desta forma, acredita-se que as MVs participam de processos fundamentais na proliferação da TE e na regulação do microambiente celular desempenhando um importante papel no desenvolvimento da neoplasia no organismo. Com o intuito de entender os possíveis papéis das MVs nesta patologia, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil das microvesículas circulantes em pacientes com diagnóstico de Trombocitemia Essencial em uso de hidroxiureia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tipo e local de estudo

Foi realizado um estudo descritivo-correlacional transversal na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), localizado na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. O estudo foi realizado no período de agosto de 2021 a fevereiro de 2023. As análises laboratoriais foram realizadas no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB), Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

2.2. Aspectos éticos

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. O projeto foi executado de acordo as normativas estabelecidas na resolução 466/12. Processo com número de parecer aprovado: 4.450.813.

2.3. População de estudo

Setenta e seis indivíduos, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, foram incluídos e categorizados em dois grupos: 38 pacientes diagnosticados com Trombocitemia essencial em tratamento e 38 indivíduos negativos para doenças infecciosas e aptos para doação de sangue da Fundação HEMOAM. Não foram incluídos pacientes com anormalidades adquiridas no processo da Hemostasia, pacientes grávidas e com diagnóstico para outra neoplasia.

2.4. Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os prontuários dos pacientes foram avaliados para coleta das características sociodemográficas e clínicas: sexo, idade, presença de esplenomegalia, manifestação de eventos trombóticos ou hemorrágicos e tempo de tratamento.

Para coleta dos dados laboratoriais foram realizados os exames: da Contagem de hemácias (RBC), Hemoglobina (HBA), Hematócrito (HTO), Contagem de Leucócitos (WBC), Contagem de Plaquetas (PLT), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), neutrófilos segmentados (%), Eosinófilos (%), Basófilos (%), Linfócitos (%) e Monócitos (%), Lactato Desidrogenase (LDH), Ácido Úrico, Tempo de Atividade da Protombina (TAP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa).

2.5. Amostras biológicas

Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubos com citrato de sódio 3,2%. As amostras foram centrifugadas a 400 ×g por 15 minutos, posteriormente os sobrenadantes / Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foram transferidos para os criotubos e armazenados no laboratório multidisciplinar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas a -80 °C. As amostras dos pacientes e do grupo controle foram coletadas em um único tempo.

2.6. Análise fenotípica de microvesículas circulantes por citometria de fluxo

A análise fenotípica de microvesículas circulantes seguiu o método padronizado pelo Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB), Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas, com o citometro de fluxo CytoFLEX S (Beckman Coulter). As amostras de sobrenadante (PPP) foram descongeladas em banho-maria a 36°C, e aliqüotadas em tubos tipo eppendorf e centrifugadas a 21475xg por 5 minutos em Temperatura Ambiente (TA) para obtenção do Plasma Livre de Plaquetas (PLP). Posteriormente tratamos as amostras com tampão citrato-heparina, e novamente centrifugamos a 21475xg rpm por 90 min a 18°C, retiramos o sobrenadante, ressuspensando o pellet a 100 µl de tampão anexina. Foram distribuídos 100 µl nos poços (placa) contendo 2 µl de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se ligaram aos marcadores de superfície específicos presentes nas populações de MVs: Anexina V-FITC (FS), CD34-PE (Cel. progenitoras), CD13-PE-Cy7 (cel. Mieloides) , CD33-APC (cel. Mieloides), CD117-Efluor450 (cel. Mieloides), CD45-APC (leucócitos), CD11c-PE-Cy5 (cel. Dendríticas), CD14-PerCP (monócitos), CD16-PE e CD66b-PE (neutrófilos), CD3-PE (células

T), CD19-APC (células B), CD56-PE-Cy5 (células NK), CD41a-PerCP (plaquetas), CD235a-PE-Cy5 (eritrócitos) e CD51/CD61-PE (células endoteliais). Incubamos por 30 minutos ao abrigo de luz em TA. Após a incubação, foi aplicado 300 µl de tampão de ligação de anexina nos poços, e por fim transferimos o conteúdo para os microtubos de citometria de fluxo. Levamos ao citometro de fluxo CytoFLEX S, que permite a detecção e caracterização de MVs numa escala de 100-900nm através da utilização de microesferas sintéticas de calibração denominadas Gigamix. Estas microesferas possuem tamanhos definidos (100nm; 160nm; 200nm; 240nm; 300nm; 500nm; 900nm) servindo como referência para caracterização de MVs. Podendo ser adquiridos 500.000 MVs/amostra. Os resultados foram expressos em frequência e número de MVs/uL de amostra biológica.

2.7. Análise estatística

As características clínicas e laboratoriais dos indivíduos estudados foram tabulados com o auxílio do programa Excel (Microsoft Office 365). Os resultados obtidos na citometria de fluxo foram analisados através do software FlowJo (v.10). Para elaboração das análises estatísticas convencionais utilizamos o software GraphPad Prism (v.9.0.1).

Verificamos a normalidade dos dados com o teste Shapiro Wilk para cada variável. Comparamos os valores entre dois grupos através do teste de Mann-Whitney, enquanto para a comparação das variáveis com três grupos, aplicamos o teste de Kruskal-Wallis. Os níveis de significância estatística definidos para todos os testes foi de $p < 0,05$.

A construção das matrizes de correlações, foram elaboradas no programa Excel (Microsoft Office 365), as associações entre os níveis quantitativos das microvesículas foram constituídas utilizando o coeficiente dos valores do teste de correlação de Spearman e as correlações selecionadas foram as que apresentaram um valor estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da população de estudo

A população de pacientes com diagnóstico confirmado para Trombocitemia essencial (TE) incluídos no estudo foram 38 pacientes e foram selecionados 38 indivíduos saudáveis para fazer parte do grupo controle (GC).

A mediana de idade do grupo controle foi de 52 anos (IIQ:51-53), enquanto a mediana de idade dos pacientes foi de 59 anos (IIQ:42-72), comparando os dois grupos, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,2175$). Existe uma predominância do sexo feminino na

população de estudo, com 32 mulheres e apenas 6 homens. No grupo controle, a predominância é para o sexo masculino com 25 homens e 13 mulheres, a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,0001$).

Tabela 1. Dados epidemiológicos e clínicos e dos pacientes com Trombocitemia Essencial e do grupo controle.

| Variáveis | GC n=38 | TE n=38 | P value |
|---|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| Idade (ano), mediana [IIQ] | 52 [51-53] | 59 [42-72] | 0,2175 |
| Feminino/Masculino, n (%) | 13/25 (34/66) | 32/6 (85/15) | <0,0001 |
| Tempo de hidroxiureia (ano), mediana [IIQ] | - | 3 [1-9] | - |
| Esplenomegalia, n (%), sim/não | - | 7 (18)/31(82) | - |
| Eventos trombóticos, n (%),sim/não | - | 6 (16)/32(84) | - |
| Eventos hemorrágicos,n (%),sim/não | - | 12(32)/26(68) | - |

Os dados estão apresentados em mediana e intervalo interquartil (IIQ), a normalidade foi testada pelo Shapiro-Wilk e comparação em entre os grupos foi feita com o teste Mann Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo $p=<0,05$. Abreviações: GC- grupo controle; TE- Trombocitemia essencial; n-número da amostragem; IIQ-intervalo interquartil.

O medicamento que os pacientes estavam utilizando no momento da coleta foi a Hidroxiureia, a mediana do tempo de tratamento desses pacientes foi de 3 anos (IIQ:1-9). O paciente com menor tempo de tratamento foi de uma semana e o com maior tempo foi de 18 anos. Ainda, dentre os pacientes estudados, 66% apresentaram histórico de alterações clínicas. Destes, 18% pacientes com esplenomegalia, 16% com eventos trombóticos e 32% com eventos hemorrágicos.

Os resultados dos testes laboratoriais hematológico, bioquímico e testes de hemostasia dos pacientes apresentaram-se dentro dos valores de referência. Apenas o volume corpuscular médio VCM e as plaquetas encontravam-se um pouco acima do valor de referência. As análises genéticas da variante *JAK2V617F* indicaram que 45% pacientes apresentaram a variante genética *JAK2V617F+* (dados apresentados no material suplementar).

3.2. Perfil geral das microvesículas plasmáticas em controles saudáveis em comparação com pacientes com trombocitemia essencial

A figura 1 demonstra um número maior de MVs estatisticamente significativo no grupo de pacientes com TE para os marcadores de Annexina V+ (FS), CD34 (cel. Progenitoras), CD13 (cel. Mieloides), CD11c (cel. Dendríticas), CD14 (monócitos), CD16 e CD66b (neutrófilos), CD3 (linfócitos T), CD19 (linfócitos B), CD56 (cel. NK) e CD235a (eritrócitos) em comparação com o grupo controle. Mesmo os marcadores que não foram estatisticamente significativos como o CD45 (leucócitos), CD41a (plaquetas) e CD51/61 (cel. Endoteliais) tiveram uma mediana maior no grupo de pacientes com TE.

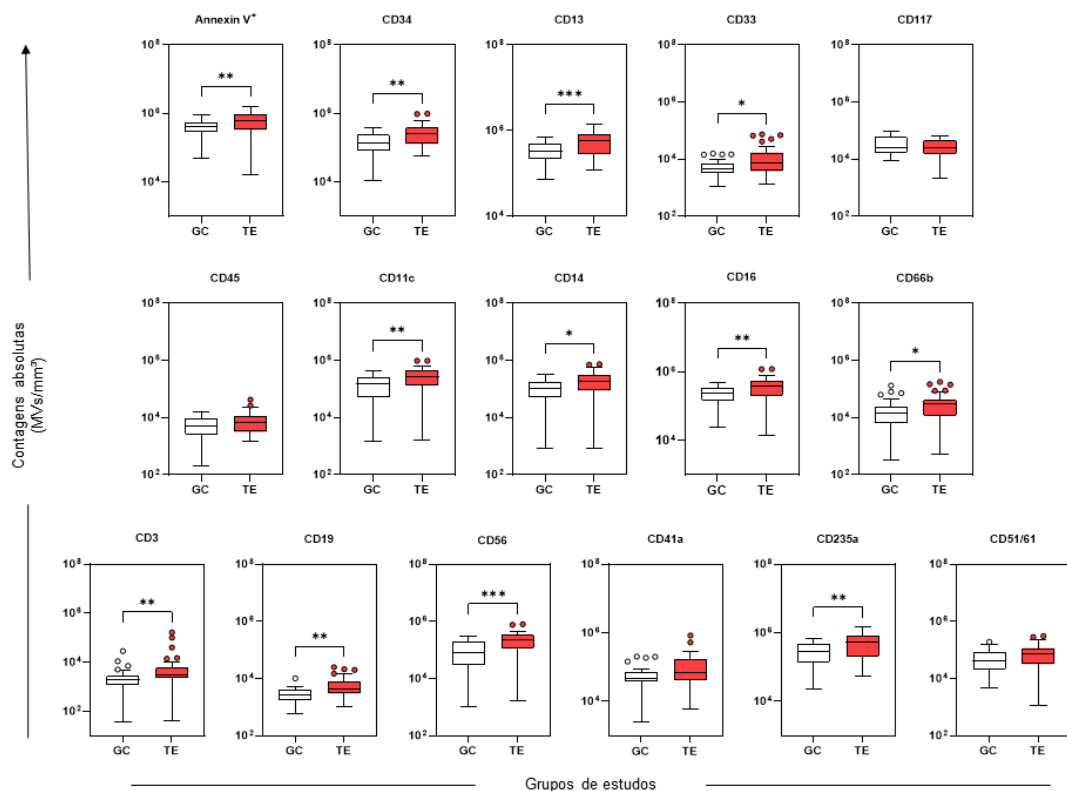


Figura 1. Perfil geral das microvesículas (MV) em controles saudáveis, em comparação com pacientes com trombocitemia essencial (TE). Os níveis de MVs foram quantificados em amostras de plasma coletadas na admissão de pacientes com TE (n=38) e controles saudáveis (n = 38). Os resultados são apresentados em gráficos, mostrando a mediana do número absoluto de MV/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os grupos foram consideradas e indicadas por asteriscos sendo p < 0,05 (*), <0,01 (**) e <0,001 (***). Abreviações: GC: Grupo Controle; TE: Trombocitemia Essencial.

3.3. Perfil geral das microvesículas plasmáticas em pacientes sem eventos clínicos em comparação com pacientes com histórico de trombose

A figura 2 demonstra um nível elevado de MVs estatisticamente significativo no grupo de pacientes que não tiveram eventos trombóticos em comparação com os que tiveram eventos trombóticos para os marcadores Annexina V+ (PS) e CD16 (neutrófilos).

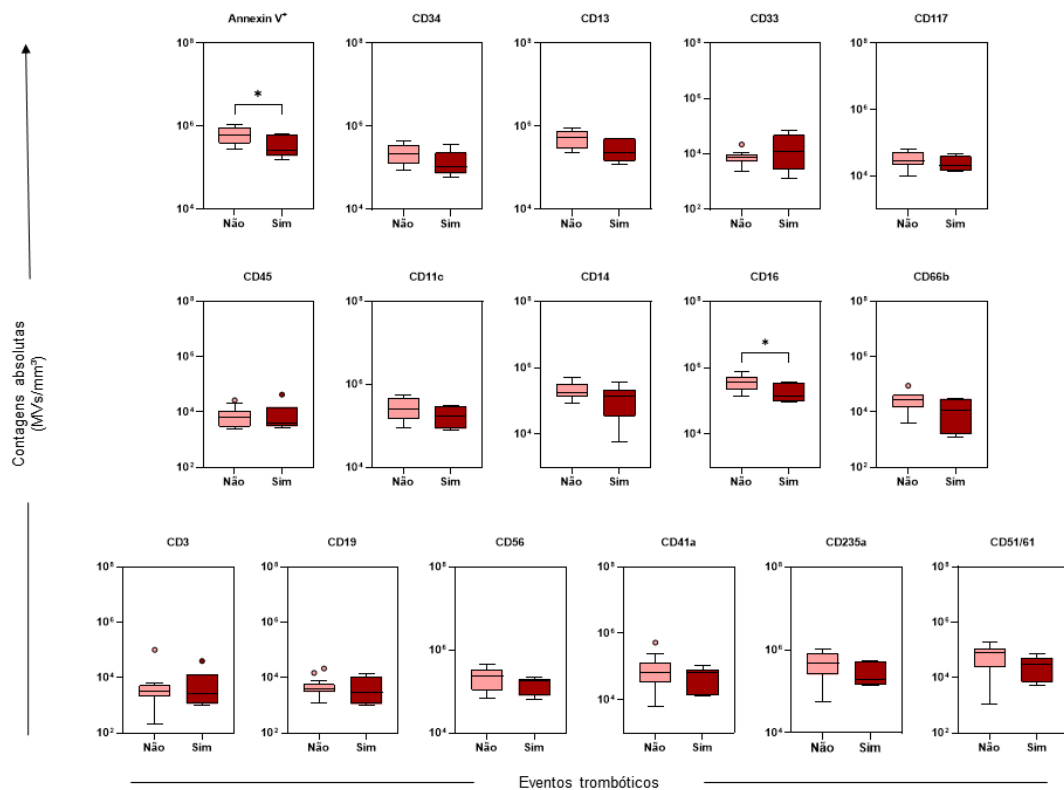


Figura 2. Perfil geral das microvesículas (MVs) em pacientes com trombocitemia essencial (TE) que não tiveram eventos clínicos, em comparação com pacientes que tiveram eventos trombóticos. Os resultados são apresentados em gráficos, mostrando a mediana do número absoluto de MVs/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os grupos foram consideradas e indicadas por asteriscos sendo $p < 0,05$ (*).

3.4. Perfil geral das microvesículas plasmáticas em pacientes sem eventos clínicos em comparação com pacientes com histórico de hemorragias

Os marcadores moleculares, CD11c (cel. dendríticas) e CD51/61 (cel. Endoteliais), foram significativamente elevados em indivíduos com eventos hemorrágicos (Fig. 3).

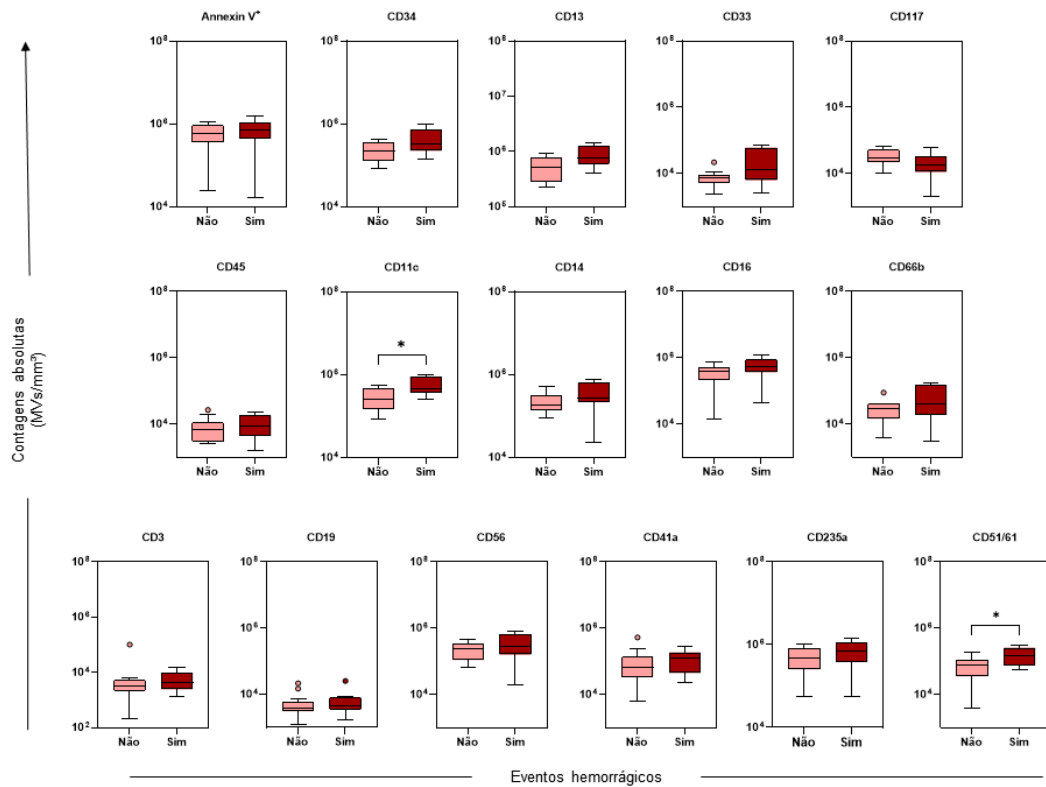


Figura 3. Perfil geral das microvesículas (MVs) em pacientes com trombocitemia essencial (TE) que não tiveram eventos clínicos, em comparação com pacientes que tiveram eventos hemorrágicos. Os resultados são apresentados em gráficos, mostrando a mediana do número absoluto de MVs/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os grupos foram consideradas e indicadas por asteriscos sendo $p < 0,05$ (*).

3.5. Perfil geral das microvesículas plasmáticas em pacientes com a variante genética *JAK2V617F* e sem a variante

A figura 4 mostra o perfil das microvesículas em pacientes de TE que não apresentaram a variante genética *JAK2V617F* (*JAK2V617F*-), em comparação com pacientes que apresentaram a variante genética (*JAK2V617F*+). O marcador CD3 (linfócitos T) foi significativamente elevado em indivíduos *JAK2V617F*-.

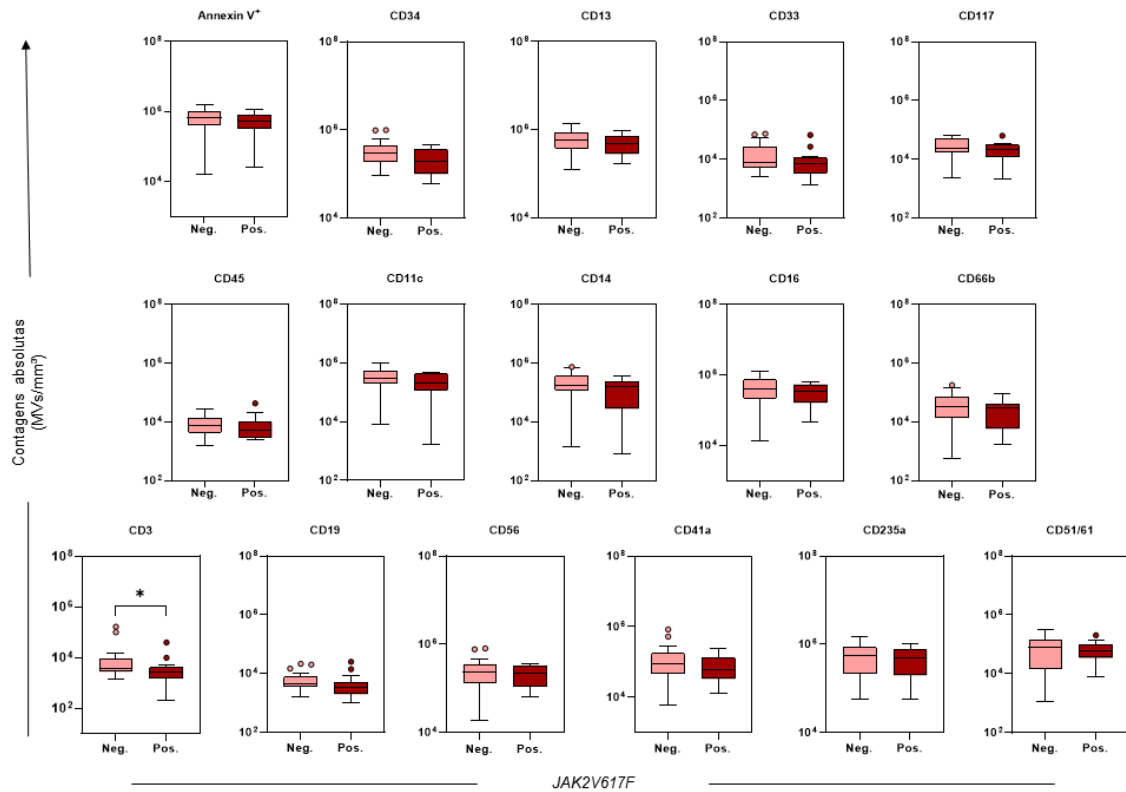


Figura 4. Perfil geral das microvesículas (MVs) em pacientes com trombocitemia essencial (TE) que não apresentaram a variante genética *JAK2V617F*, em comparação com pacientes que apresentaram a variante genética *JAK2V617F*. Os resultados são apresentados em gráficos, mostrando a mediana do número absoluto de MV/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os grupos foram consideradas e indicadas por asteriscos sendo $p < 0,05$ (*). Abreviações: Neg- negativo; Pos- positivo.

3.6. Perfil geral das microvesículas plasmáticas em pacientes categorizados de acordo com o tempo de tratamento

A figura 5 mostra o perfil das microvesículas em pacientes de TE categorizados em dois grupos com base no tempo de tratamento, o primeiro grupo sendo composto por pacientes com menos de 5 anos de tratamento e o segundo grupo com 5 anos ou mais de tratamento. A análise de dados mostrou um número maior de MVs estatisticamente significativo no primeiro grupo em comparação com o segundo grupo nos marcadores Anexina V+ (FS) e CD19 (linfócito B).

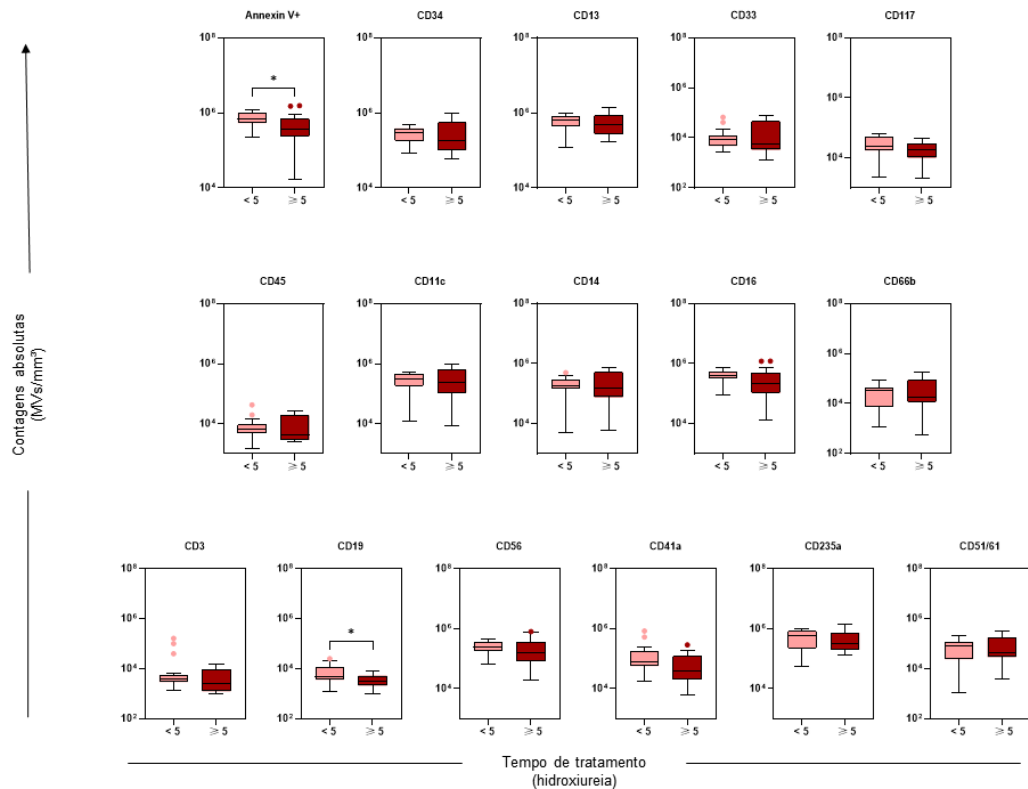


Figura 5. Perfil geral das microvesículas (MVs) em pacientes com trombocitemia essencial (TE) categorizados em dois grupos com base no tempo de tratamento, sendo <5 e ≥ 5 . Os resultados são apresentados em gráficos, mostrando a mediana do número absoluto de MV/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas entre os grupos foram consideradas e indicadas por asteriscos sendo $p < 0,05$ (*).

3.7. Matriz de correlação dos grupos de estudo

A figura 6 mostra todas as matrizes de correlações dos grupos de estudo, a matriz avaliou todos os marcadores de microvesículas e investigou a existência de correlações positivas ou negativas entre essas microvesículas, sendo selecionadas apenas as correlações estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

No grupo controle é possível observar correlações positivas fortes entre as populações de microvesículas, se comparamos ao grupo de pacientes é possível notar que o número de correlações diminui e que algumas das correlações fortes no GC se apresentam como correlações moderadas no grupo TE.

Nas matrizes dos grupos sem eventos, com esplenomegalia, com eventos trombóticos e eventos hemorrágicos é possível notar uma diferença nas correlações que são estabelecidas nesses grupos. Os pacientes sem eventos e com eventos hemorrágicos exibiram correlações

positivas fortes e moderadas. Os grupos de pacientes com esplenomegalia e histórico de trombose possuem bem poucas correlações positivas comparados aos outros grupos.

Comparando as matrizes dos pacientes com idade menor que 60 anos e com 60 anos ou mais, é possível notar que os pacientes com maior idade retêm mais correlações positivas entre as populações de microvesículas.

O grupo *JAK2V617F+* possui menos correlações positivas do que o grupo *JAK2V617F-*.

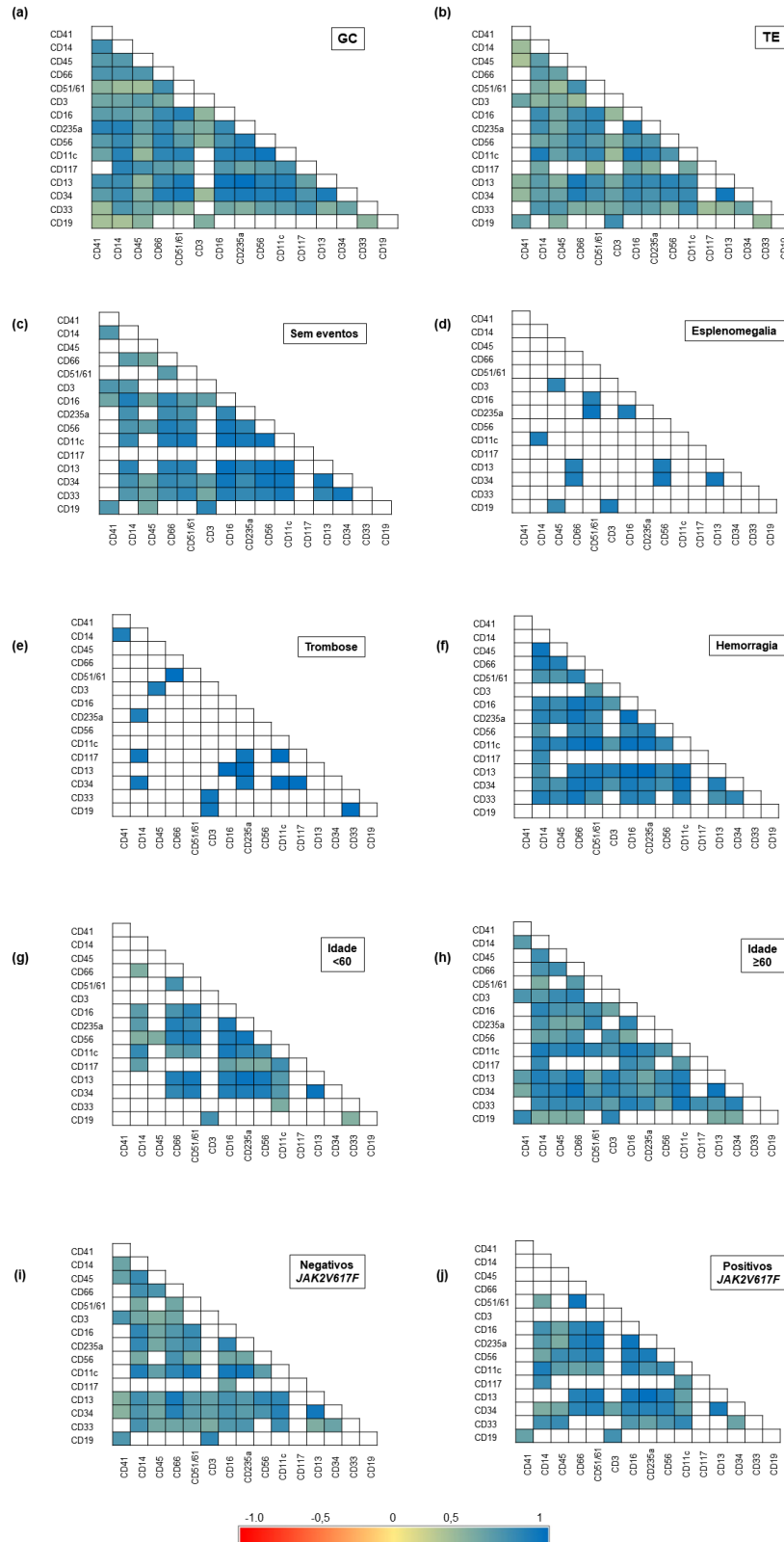


Figura 6. Matriz de correlações dos grupos de estudo, o grau de correlação é indicado pelas cores sendo ■ = -1, indicando correlações negativas, ■ = 0, não tem correlações e ■ = 1, indicando correlações positivas. As matrizes de correlação exibem associação significativa ($p \leq 0,05$). (a) grupo controle, (b) pacientes com trombocitemia essencial, (c) pacientes sem eventos clínicos, (d) paciente com esplenomegalia, (e) pacientes com eventos trombóticos, (f) pacientes com eventos hemorrágicos, (g) pacientes com idade menos que 60 anos, (h) pacientes com idade igual ou maior que 60 anos, (i) pacientes negativos para a variante *JAK2V617F* e (j) pacientes positivos para a variante *JAK2V617F*.

4. DISCUSSÃO

A TE possui um mecanismo de ação diverso que pode envolver células, citocinas e a resposta celular de cada paciente. A proliferação clonal das células-tronco hematopoiéticas causa alterações não somente quantitativa como qualitativa pois essas células possuem um fenótipo pró-coagulante que estimulam a inflamação no organismo. As citocinas interagem com o endotélio vascular e as plaquetas, eritrócitos e leucócitos se aderem à parede vascular graças aos receptores de adesão do endotélio contribuindo para o estado de hipercoagulabilidade. Assim, os fenômenos relacionados à trombocitemia essencial requerem uma rede com inúmeras moléculas que são capazes de ativar o sistema hemostático dos pacientes ¹².

A mediana de idade do grupo em estudo está na quinta década de vida. Esse dado está em conformidade com a incidência estimada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ² e corrobora com outros estudos brasileiros ^{13, 14}, como o realizado Criciúma, Santa Catarina, em que a média de idade encontrada foi 57,33 anos ¹⁵ e o estudo realizado nos Estados Unidos que coletou dados de dois grandes provedores de saúde Thomson Reuters MarketScan Data e o Ingenix Impact National Managed Care Integrated Health Care Information Solutions (IHCIS) em que a média encontrada foi 57,2 anos e 52,6 anos respectivamente para cada banco de dados ¹⁶.

Segundo dados publicados pela OMS estima-se que existe um predomínio do sexo feminino nesta patologia¹⁷ corroborando com os dados obtidos nessa pesquisa. Esse dado é semelhante a outro estudo realizado com NMPs no Brasil em que a população era composta por 31 mulheres que representavam 55% dos pacientes ¹³.

O tratamento da TE tem como objetivo normalizar as contagens sanguíneas periféricas nos pacientes que podem tolerar a intervenção farmacológica ¹⁸. Os pacientes incluídos no estudo estão em tratamento, com o agente citorredutor Hidroxiureia (HU) e os regimes de tratamento foram em torno de três anos.

A escolha do melhor tratamento para os pacientes é feita por meio da avaliação clínica, avaliação do risco de trombose e os exames laboratoriais. A citorredução é indicada aos pacientes com idade superior a 60 anos, com histórico de trombose, e/ou com uma contagem superior a $1.500 \times 10^9 /L$ de plaquetas. A HU é escolhida nesses casos por apresentar uma maior eficiência na redução de distúrbios trombóticos, porém existem outros medicamentos que

podem ser indicados a pacientes de alto risco, como o interferon alfa e a anagrelida¹⁹. Nossos pacientes demonstraram uma resposta favorável ao tratamento e a maioria dos exames laboratoriais estavam dentro do valor de referência.

Sabe-se que o quadro de inflamação crônica da TE pode levar a ocorrência de eventos clínicos como trombozes e hemorragias²⁰. Porto-Soares et al. observaram que 24% pacientes estudados apresentaram eventos trombóticos, uma porcentagem maior do que o encontrado em nosso estudo, porém a porcentagem de pacientes que apresentam esplenomegalia foi apenas 8% dos pacientes¹⁴. Os episódios hemorrágicos são menos recorrentes na TE do que a trombose e acontecem normalmente após o diagnóstico²¹. Entretanto, encontramos uma porcentagem maior de episódios hemorrágicos do que trombóticos na nossa população.

As microvesículas já foram descritas na literatura em diversas patologias como na sepse²², no câncer e em doenças hematológicas²³. Neste estudo observou-se um predomínio de MVs derivadas de células progenitoras, mieloides, dendríticas, monócitos, neutrófilos, linfócitos T, linfócitos B, células NK e eritrócitos em pacientes com TE. Esse dado corrobora com os outros estudos que foram realizados analisando as microvesículas na Trombocitemia Essencial^{24,25,26,27, 28}.

A Anexina V é um marcador celular que pode ser utilizado para marcação de microvesículas. É uma proteína que se liga ao cálcio de 36 kDa e que possui alta afinidade pela fosfatidilserina (FS)²⁹. A translocação da FS para o folheto externo da membrana plasmática ocorre durante a biogênese das MVs. A atividade pró-coagulante das MVs pode ser associada a presença da FS, que é carregada negativamente e consegue atrair eletrostaticamente proteínas carregadas positivamente que fazem parte do processo de coagulação, como os fatores VII, IX e X, e a protrombina³⁰. A FS é capaz não apenas de aumentar indiretamente a capacidade de coagulação, como também de facilitar a fusão de membrana e transferência de cargas³¹.

No nosso estudo não foi realizado a análise da influência da atividade pró-coagulante que as MVs carregadas negativamente pelas FS exercem no plasma dos pacientes, porém diferentes autores já comprovaram que esta atividade é maior em pacientes com NMP do que nos grupos controles^{32, 25, 33, 34}.

A trombocitemia essencial é marcada pela proliferação desordenada da linhagem mieloide, neste caso os megacariócitos. Portanto marcadores como o CD34, expresso em células tronco e progenitoras e o CD13, CD33, marcadores de células de linhagem mieloide, podem estar

presentes em níveis elevados nessa patologia. O alto número de MVs derivadas dessas células também poderia indicar que está ocorrendo hematopoiese extramedular ³⁵.

Não existem estudos com MVs-CD34+ na TE, mas essa população de MVs foi estudada em outras patologias que levantam a possibilidade de utilizar o CD34 como um biomarcador de prognóstico e de doença residual mínima ^{36,37}.

Em estudos anteriores os níveis de microvesículas derivadas de plaquetas (MVs-P) na TE estavam sempre altos ^{24, 26, 27, 28}. No nosso estudo a mediana da contagem absoluta de MVs-P nos pacientes estava mais alta no grupo TE, porém não foi estatisticamente significativo, este dado corrobora com o encontrado por Connor ³⁸. Isso foi notado também na população de MVs derivadas de células endoteliais, que apresentaram níveis elevados, porém não foi estatisticamente significativo, diferente do que foi publicado anteriormente em outros estudos em que essa diferença foi estatisticamente significativa ^{24, 26}.

O nível elevado de MVs derivadas de eritrócitos (235a) granulócitos (CD45, CD16 e CD66b), monócitos (CD14), linfócitos T e B (CD3 e CD19) e células NK (CD56) foram encontradas no grupo TE. Populações de MVs semelhantes foram encontradas no estudo de Trappenburg et al ²⁴. Também encontramos um número alto de microvesículas derivadas de células dendríticas (CD11c), porém não há dados que corroborem com esse achado.

As hemácias podem exercer um papel dúbio como pró e anticoagulantes ³⁹ e as microvesículas derivadas de eritrócitos já foram apontadas como iniciadoras junto com o fator XI na geração de trombina ^{40, 41}. A presença de populações de MVs derivadas de células do sistema imune, podem ser explicadas pela atuação dessas células na fisiopatologia da TE ao liberar citocinas que promovem o estado inflamatório dos pacientes ⁴².

Quando comparamos as populações de MVs dos pacientes com histórico de trombose e sem histórico, o grupo de pacientes que não possuía histórico de nenhum evento clínico detinha o maior número de MVs em todas as populações, sendo estatisticamente significativo para a Anexina V e o CD16. Como os pacientes incluídos no estudo estão em tratamento, a citorredução pode afetar a quantidade de MVs circulantes, como já foi relatado antes na literatura ^{43, 44, 28}.

O estudo realizado por Aswad et al encontrou um nível elevado de MVs derivadas de células endoteliais em pacientes com histórico de eventos hemorrágicos ²⁷. Do mesmo modo, no presente estudo, o grupo com histórico de eventos hemorrágicos apresentam um nível maior de

MVs em todos os marcadores do grupo com eventos hemorrágicos, com CD11c (cel. Dendríticas) e CD51/61 (cel. Endoteliais) sendo estatisticamente significativo. Assim, acredita-se microvesículas endoteliais circulantes elevadas podem indicar que houve dano ao endotélio ^{45, 46}.

Três variantes genéticas podem ser encontradas na TE, a mais frequente é a *JAK2V617F* identificada em 50-60% dos casos, a variante no éxon 9 do gene *CALR* (tipo 1, 52-pb deleção e tipo 2, 5-pb inserção) em 30% dos casos e a variante no gene *MPL* a *W515L* em 3% dos casos ⁴⁷.

O grupo *JAK2V617F+* quando comparado ao grupo *JAK2V617F-* exibiu menos MVs provenientes CD3 (linfócitos T). Este dado não corrobora com o que foi descrito na literatura ^{26, 28}. Essa diminuição de MVs pode estar associado a modulação da resposta imunológica. Um estudo publicado por Hekimoğlu et al. mostrou que as células *JAK2V617F+* liberam MVs capazes de carregar fragmentos de DNA de *JAK2V617F+*, possuindo a capacidade de regular células vizinhas, modular a resposta imunológica e atuar na patogênese da trombose nas NMPs ⁴⁸. A modulação da resposta imunológica pode ocorrer por meio da proteína de morte programada (PD-1) expressa pelas células *JAK2V617F+* que é capaz de diminuir a ativação de células T ⁴⁹.

A maioria dos pacientes com histórico de trombose possuem a variante *JAK2V617F+*, podendo haver possibilidade de que, apesar do número menor de MVs circulantes nos pacientes *JAK2V617F+*, essas MVs podem ser mais pró-coagulante e estar exercendo um papel no processo da trombose. Estudos indicaram que os pacientes *JAK2V617F+* possuem MVs com maior atividade pró-coagulante ^{32, 25, 33}.

A diminuição do número de MVs circulantes nos pacientes *JAK2V617F+* pode estar associada ao tratamento citorrédutor. Alguns estudos demonstram que a resposta ao tratamento melhora ao longo do tempo. O estudo realizado por Dingli e colabores, mostrou que após 27 meses de tratamento com a HU houve uma redução na incidência dos eventos trombóticos e com 73 meses a maioria dos pacientes apresentava uma melhora contínua com o tratamento ⁵⁰.

O estudo de Besses et al, observou que mais de 50% dos pacientes diagnosticados com TE tratados com HU, como tratamento de primeira linha, apresentavam uma diminuição significativa na carga alélica da variante *JAK2V617F* após 36 meses ⁵¹.

Esse achado corrobora com o perfil de microvesículas dos pacientes estudados os pacientes com menos de 5 anos de tratamento exibiram um maior nível de MVs totais (Anexina V+) e de MVs derivadas de linfócitos B (CD19) estatisticamente significativo e as outras populações de MVs também exibiam uma mediana maior do que os pacientes com 5 anos ou mais de tratamento.

Levando em consideração a resposta das MVs ao tratamento, sugerimos que a hidroxiureia pode atuar na diminuição das populações de MVs tendo uma resposta melhor ao longo do tratamento. Para corroborar com essa hipótese, categorizamos os pacientes em três grupos por tempo de tratamento e foi possível notar que apesar de não ter nenhum valor estatisticamente significativo as medianas das populações de MVs foram diminuindo conforme o tempo de tratamento aumentava (dados apresentados em material suplementar).

A análise das correlações apontou que diferente do grupo controle os pacientes com TE apresentavam menos correlações entre as populações de MVs-P), podemos associar essa perda ao tratamento. Os pacientes que não apresentaram eventos clínicos mantiveram a maioria das correlações, junto com o grupo com histórico de eventos hemorrágicos, porém o grupo com histórico de hemorragia não apresentou correlações na população de MVs-P. Assim como o grupo com esplenomegalia, que perdeu quase todas as correlações, isso poderia indicar que o sequestro de células afeta a correlação entre as populações de Mvs. Os pacientes *JAK2V617F+* perderam várias correlações em especial é possível notar que perdem as correlações das populações de MVs-P.

No grupo de pacientes com trombose podemos observar correlações positivas entre as populações de MVs de monócitos e plaquetas, neutrófilos e células endoteliais. É relatado na literatura que os leucócitos exercem um papel na trombose⁵² participando da ativação celular, produção de espécies reativas de oxigênio, interagindo com as plaquetas e células endoteliais, facilitando agregação plaquetária e a adesão ao endotélio⁴⁷. Falanga et al, observou que leucócitos e plaquetas transferem MVs entre si⁵³ podendo favorecer mudança de fenótipos mutuamente das células envolvidas.

A quantificação de MVs demonstrou que os pacientes com idade menor do que 60 anos apresentavam mais microvesículas do que os pacientes com 60 anos ou mais, porém os pacientes mais velhos conservaram mais correlações positivas entre as populações de MVs. Este fenômeno pode estar relacionado com o avanço da idade em que ocorre a diminuição da liberação e o aumento da internalização dessas MVs pelas células⁵⁴.

Esse estudo possui limitações, principalmente devido ao número limitado da população de estudo sendo necessário a realização de mais estudos para avaliar a influência do tratamento nas MVs, com uma população de estudo maior, com tratamentos variados e se possível avaliar a resposta antes e depois do início do tratamento.

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que os pacientes com trombocitemia essencial em uso do citorredutor Hidroxiureia apresentam microvesículas elevadas derivadas de diversas células como, células progenitoras, mieloides, dendríticas, monócitos, neutrófilos, linfócitos B e T, células NK e eritrócitos. Nosso estudo é o primeiro a utilizar um painel tão amplo para avaliar as populações de microvesículas na TE que demonstrou que várias populações de MVs podem contribuir na patogênese da TE e que mesmo após o tratamento o nível de MVs segue alto nos pacientes. Nosso estudo também é o primeiro a fazer uma associação entre a diminuição do número total de MVs circulantes com o aumento do tempo de tratamento.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Andréa M. Tarragô idealizou, supervisionou e conseguiu arrecadar fundos para a realização do estudo; Emanuela V. B. Alves, Lucivana P. S. Mourão e Andréa M. Tarragô participaram da elaboração do manuscrito e da pesquisa bibliográfica; Emanuela V. B. Alves, Miliane A. de Sousa, Iandara M. L. de Souza, Dania G. Torres, Jhemerson F. Paes, Deborah C. de Aquino, Erycka A. de Mesquita, Bruno E. F. do Nascimento, Wanessa H. Laranjeira, Marina M. A. Silvestrini, Armanda Barbosa, Andréa Teixeira-Carvalho, Allyson G. da Costa, Lucivana P. S. Mourão e Andréa M. Tarragô realizaram a interpretação formal dos dados; Emanuela V. B. Alves, Marina M. A. Silvestrini, Iandara M. L. de Souza, Andréa Teixeira-Carvalho, Olindo A. Martins Filho, Allyson G. Costa e Andréa M. Tarragô realizaram análise estatística; Adriana Malheiro, Rosângela S. Abreu, Cristina Mesquita, Nelson A. Fraiji, Suely M. Rezende, George A. V. Silva, Andréa Teixeira-Carvalho, Allyson G. da Costa, Lucivana P. S. Mourão e Andréa M. Tarragô revisaram e editaram o manuscrito. Todos os autores revisaram o manuscrito.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe de apoio do Laboratório de Genômica (HEMOAM), ao Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores - GIPB, (FIOCRUZ-Minas).

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) Programa Pró-Estado — nº 002/2008, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) nº 007/2018 e nº 005/2019; Programa POSGRAD — nº 005/2022, Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os financiadores não tiveram

nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar, ou preparação do manuscrito.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ji, S. *et al.* Phagocytosis by endothelial cells inhibits procoagulant activity of platelets of essential thrombocythemia in vitro. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **18**, 222–233 (2020).
2. Hoffbrand, A. V, Higgs, D. R., Keeling, D. M. & Mehta, A. B. *Postgraduate Haematology*. (Wiley-Blackwell, 2016).
3. Ferrer-Marín, F., Cuenca-Zamora, E. J., Guijarro-Carrillo, P. J. & Teruel-Montoya, R. Emerging role of neutrophils in the thrombosis of chronic myeloproliferative neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 1–14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms22031143> (2021).
4. Longhitano, L. *et al.* The role of inflammation and inflammasome in myeloproliferative disease. *Journal of Clinical Medicine* vol. 9 1–11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm9082334> (2020).
5. Ståhl, A. lie, Johansson, K., Mossberg, M., Kahn, R. & Karpman, D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatric Nephrology* vol. 34 11–30 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3816-z> (2019).
6. Yates, A. G. *et al.* In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jev2.12151> (2022).
7. Clancy, J. W., Schmidtman, M. & D’Souza-Schorey, C. The ins and outs of microvesicles. *FASEB BioAdvances* vol. 3 399–406 Preprint at <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00127> (2021).
8. Lv, Y. M., Tan, J., Miao, Y. & Zhang, Q. The role of microvesicles and its active molecules in regulating cellular biology. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 23 7894–7904 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jcmm.14667> (2019).
9. Barteneva, N. S. *et al.* Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol* **14**, (2013).
10. Forte, D., Barone, M., Palandri, F. & Catani, L. The “vesicular intelligence” strategy of blood cancers. *Genes* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/genes12030416> (2021).
11. Rackov, G. *et al.* Vesicle-mediated control of cell function: The role of extracellular matrix and microenvironment. *Frontiers in Physiology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00651> (2018).
12. Barbui, T., Finazzi, G. & Falanga, A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood* vol. 122 2176–2184 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-460154> (2013).
13. Pagliarini-e-Silva, S. *et al.* Evaluation of the association between the JAK2 46/1 haplotype and chronic myeloproliferative neoplasms in a Brazilian population. *Clinics* **68**, 5–9 (2013).
14. Porto-Soares, M. A. *et al.* Clinical and molecular profile of a Brazilian cohort of patients with classical BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematol Transfus Cell Ther* **42**, 238–244 (2020).
15. Lima, J. G., Rauber, L. & Lopes, T. B. Perfil dos pacientes com neoplasia mieloproliferativa cromossomo philadelfia negativo na unidade de alta complexidade oncológica do Hospital São José em Criciúma/SC no período de 2008 a 2015. *Arquivos Catarinenses de Medicina* **47**, 2–12 (2018).

16. Mehta, J., Wang, H., Iqbal, S. U. & Mesa, R. Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leuk Lymphoma* **55**, 595–600 (2014).
17. Khoury, J. D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* vol. 36 1703–1719 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1> (2022).
18. Agarwal, M. B. *et al.* Myeloproliferative neoplasms working group consensus recommendations for diagnosis and management of primary myelofibrosis, polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* **36**, 3–16 (2015).
19. Santoro, C. *et al.* Role of treatment on the development of secondary malignancies in patients with essential thrombocythemia. *Cancer Med* **6**, 1233–1239 (2017).
20. Awada, H., Voso, M. T., Guglielmelli, P. & Gurnari, C. Essential thrombocythemia and acquired von willebrand syndrome: The shadowlands between thrombosis and bleeding. *Cancers* vol. 12 1–19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers12071746> (2020).
21. Farina, M., Russo, D. & Hoffman, R. The possible role of mutated endothelial cells in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* vol. 106 2813–2823 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.278499> (2021).
22. Puga, M. L. *et al.* Performance of microvesicles as biomarkers of clinical outcome in sepsis and trauma: A pilot study. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **146**, (2022).
23. Falanga, A., Tartari, C. J. & Marchetti, M. Microparticles in tumor progression. in *Thrombosis Research* vol. 129 (2012).
24. Trappenburg, M. C. *et al.* Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* **94**, 911–918 (2009).
25. Kissova, J., Ovesna, P., Bulikova, A., Zavřelova, J. & Penka, M. Increasing procoagulant activity of circulating microparticles in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: A single-centre experience. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **26**, 448–453 (2015).
26. Zhang, W. *et al.* Clinical significance of circulating microparticles in Ph- myeloproliferative neoplasms. *Oncol Lett* **14**, 2531–2536 (2017).
27. Aswad, M. H. *et al.* High Level of Circulating Microparticles in Patients with BCR/ABL Negative Myeloproliferative Neoplasm - a Pilot Study. *Klin. Onkol* **32**, 109–116 (2019).
28. Aswad, M. H., Kissova, J., Ovesna, P., Rihova, L. & Penka, M. The clinical significance of circulating microparticles concerning thrombosis in BCR/ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *In Vivo (Brooklyn)* **35**, 3345–3353 (2021).
29. Demchenko, A. P. Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* vol. 65 157–172 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9481-y> (2013).
30. Voukalis, C., Shantsila, E. & Lip, G. Y. H. Microparticles and cardiovascular diseases. *Annals of Medicine* vol. 51 193–223 Preprint at <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1609076> (2019).
31. Aharon, A., Rebibo-Sabbah, A., Tzoran, I. & Levin, C. Extracellular Vesicles in Hematological Disorders. *Rambam Maimonides Med J* **5**, e0032 (2014).
32. Marchetti, M. *et al.* Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia. *Am J Hematol* **89**, 68–73 (2014).

33. Charpentier, A. *et al.* Microparticle phenotypes are associated with driver mutations and distinct thrombotic risks in essential thrombocythemia. *Haematologica* vol. 101 e365–e368 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144279> (2016).
34. Taniguchi, Y. *et al.* Elevated plasma levels of procoagulant microparticles are a novel risk factor for thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* **106**, 691–703 (2017).
35. Moliterno, A. R., Williams, D. M., Rogers, O., Isaacs, M. A. & Spivak, J. L. Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: Roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Exp Hematol* **36**, 1480-1486.e2 (2008).
36. Zhang, J. *et al.* Selective surface marker and miRNA profiles of CD34+ blast-derived microvesicles in chronic myelogenous leukemia. *Oncol Lett* **14**, 1866–1874 (2017).
37. Sukriti, S. *et al.* Microvesicles in hepatic and peripheral vein can predict nonresponse to corticosteroid therapy in severe alcoholic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* **47**, 1151–1161 (2018).
38. Connor, D. E., Ma, D. D. F. & Joseph, J. E. Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. *Thromb Res* **132**, 572–577 (2013).
39. Weisel, J. W. & Litvinov, R. I. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* vol. 17 271–282 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jth.14360> (2019).
40. Van Beers, E. J. *et al.* Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* **94**, 1513–1519 (2009).
41. Rubin, O. *et al.* Red blood cell-derived microparticles isolated from blood units initiate and propagate thrombin generation. *Transfusion (Paris)* **53**, 1744–1754 (2013).
42. Carobbio, A. *et al.* Leukocytosis and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: A systematic review and meta-analysis. *Blood Advances* vol. 3 1729–1737 Preprint at <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000211> (2019).
43. Piccin, A. *et al.* Observational retrospective study of vascular modulator changes during treatment in essential thrombocythemia. *Translational Research* **184**, 21–34 (2017).
44. Barone, M. *et al.* A specific host/microbial signature of plasma-derived extracellular vesicles is associated to thrombosis and marrow fibrosis in polycythemia vera. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
45. Jung, K. H. *et al.* Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol* **66**, 191–199 (2009).
46. Lackner, P. *et al.* Cellular microparticles as a marker for cerebral vasospasm in spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **41**, 2353–2357 (2010).
47. Torres, D. G. *et al.* JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12020291> (2022).
48. Hekimoğlu, H., Toprak, S. F. & Sözer, S. JAK2V617F-Positive Endothelial Cells Induce Apoptosis and Release JAK2V617F-Positive Microparticles. *Turkish Journal of Hematology* **39**, 13–21 (2022).
49. Prestipino, A. *et al.* Oncogenic JAK2 V617F causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med* vol. 10 <http://stm.sciencemag.org/> (2018).

50. Dingli, D. & Tefferi, A. Hydroxyurea: The Drug of Choice for Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. *Myeloproliferative Disease* **1**, 69–74 (2006).
51. Besses, C. *et al.* Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia patients. *Br J Haematol* **152**, 413–419 (2011).
52. Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A., Balducci, D. & Barbui, T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* **33**, 523–530 (2005).
53. Falanga, A. *et al.* V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* **35**, 702–711 (2007).
54. Eitan, E. *et al.* Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes. *Sci Rep* **7**, (2017).

Material Suplementar

Tabela 2. Características laboratoriais dos pacientes e valores de referências.

| Variáveis | TE pacientes n=38 | Valores de Referência |
|--|-------------------------|-----------------------|
| <i>JAK2V617F+</i> , n (%) | 12 (32) | Negativo |
| RBC, mediana [IQR], mil/mm ³ | 3,58 [3,23-4,57] | 3,9-5,3 |
| Ht, mediana [IQR], % | 37,65 [35,80-42,25] | 36-49 |
| Hb, mediana [IQR], g/dL | 12,60 [11,83-13,93] | 12-16 |
| VCM, mediana [IQR], fL | 104,40 [95,05-112,70] | 80-99 |
| HCM, mediana [IQR], pg | 33,55 [31,38- 37] | 33-37 |
| CHCM, mediana [IQR], g/dL | 32,85 [32,10- 33,63] | 33-37 |
| WBC, mediana [IQR], x 10 ³ mm ³ | 5025 [3718- 6970] | 3600-11000 |
| Neutrófilos, mediana [IQR], % | 62,50 [57,20- 68,10] | 40-78 |
| Linfócitos, mediana [IQR], % | 29,90 [23,78- 36,65] | 20-50 |
| Monócitos, mediana [IQR], % | 4,80 [3,77- 5,85] | 2-6 |
| Eosinófilos, mediana [IQR], % | 2 [1,20- 2,47] | 1-5 |
| Basófilos, mediana [IQR], % | 0,70 [0,40- 1,02] | 0-2 |
| Plaquetas, mediana [IQR], x10 ³ mm ³ | 448000 [350250- 521250] | 150000-400000 |
| LDH, mediana [IQR], U/L | 408,50 [363,10- 460,80] | 195-453 |
| Ácido Úrico, mediana [IQR], mg/dL | 4 [2,77- 4,80] | 2,6-7,2 |
| TP, mediana [IQR], seg | 11,25 [10,78- 12,20] | 10-14 |
| INR mediana [IQR] | 0,96 [0,92- 1,04] | 0,80-1 |
| TTPa, mediana [IQR], seg | 30,75 [28,33-33,08] | 24-40 |
| Fibrinogênio, mediana [IQR], mg/dL | 299 [254-377] | 200-400 |

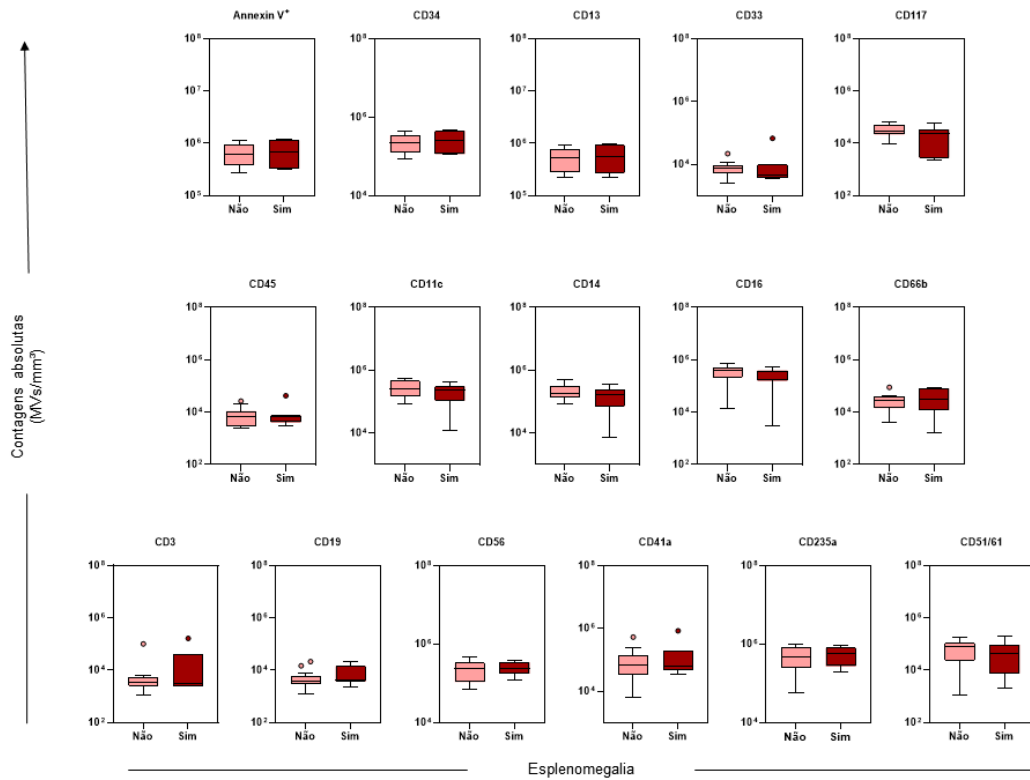


Figura 7. Perfil geral das microvesículas (MVs) em pacientes com trombocitemia essencial (TE) que não tiveram esplenomegalia, em comparação com pacientes que tiveram esplenomegalia. Os resultados são apresentados em gráficos, mostrando a mediana do número absoluto de MV/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Não houve diferenças estatisticamente significativas.

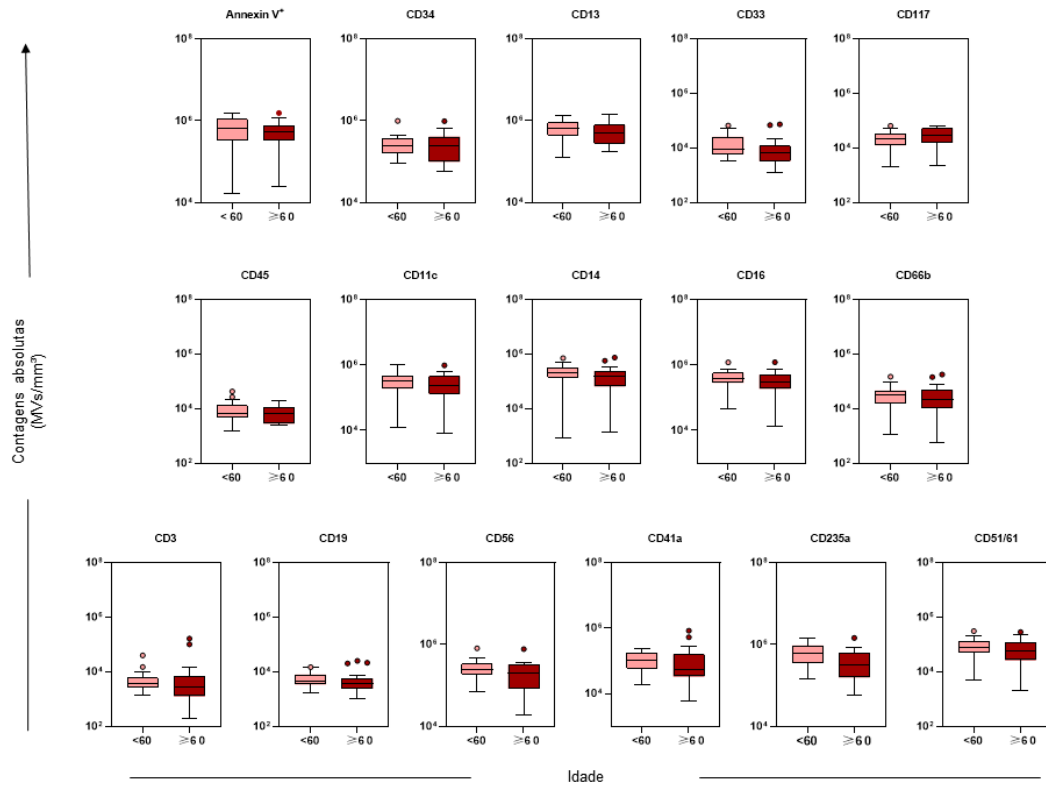


Figura 8. Perfil geral das microvesículas (MVs) em pacientes com trombocitemia essencial (TE) com idade menor que 60 anos, em comparação com pacientes com 60 anos ou mais. Os resultados são apresentados em gráficos, mostrando a mediana do número absoluto de MV/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Não houve diferenças estatisticamente significativas.

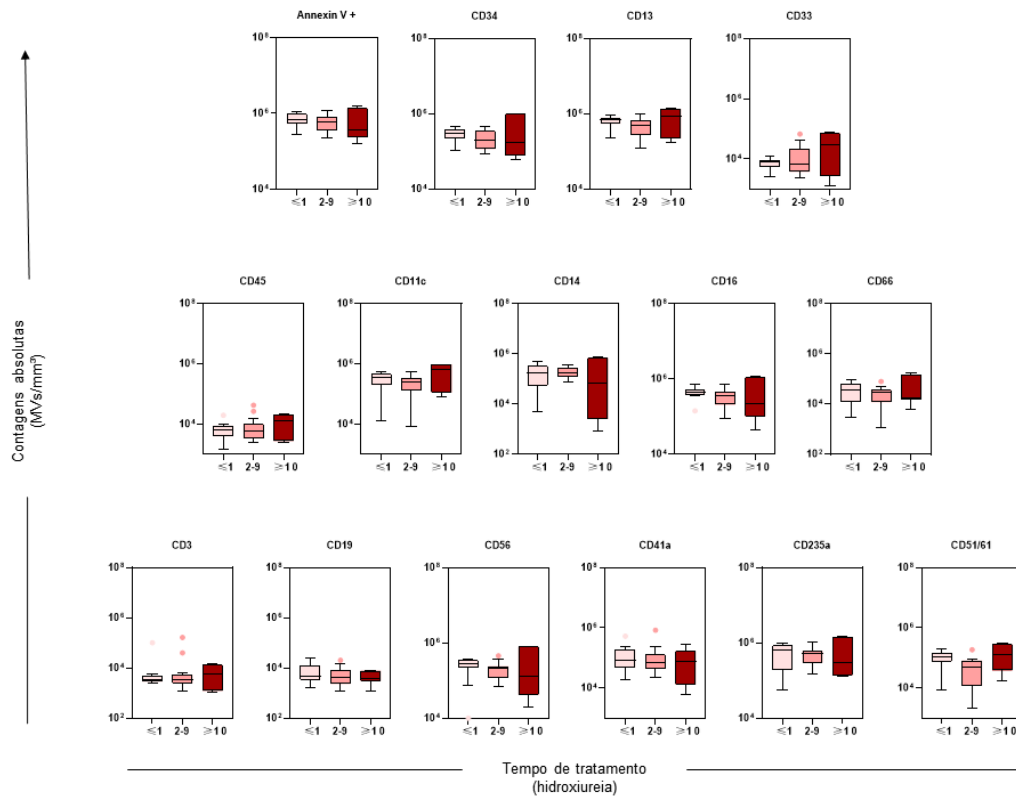


Figura 9. Perfil geral das microvesículas (MVs) em pacientes com trombocitemia essencial (TE) categorizados em três grupos com base no tempo de tratamento, sendo ≤ 1 , 2-5 e ≥ 10 . Os resultados são apresentados em gráficos, mostrando a mediana do número absoluto de MVs/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Não houve diferenças estatisticamente significativas.

5. CONCLUSÃO

Os pacientes incluídos no estudo estavam na quinta década de vida, são predominantemente mulheres, estavam em tratamento com o citorredutor hidroxiureia e 66% apresentaram histórico de alterações clínicas. A maioria dos exames laboratoriais dos pacientes estavam dentro dos valores de referência. As análises genéticas indicaram que 45% dos pacientes apresentavam a variante genética *JAK2V617F+*.

A análise do perfil das microvesículas circulantes dos pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial em uso de hidroxiureia, mostrou que esses pacientes possuem mais microvesículas circulantes do que indivíduos saudáveis e que diversas populações de MVs estão elevadas como as células progenitoras (CD34), mieloides (CD13, CD33), dendríticas (CD11c), monócitos (CD14), neutrófilos (CD16 e CD66b), linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD19), células NK (CD56) e eritrócitos (CD234a).

Esse amplo painel nos permitiu avaliar que existe diversas populações de MVs envolvidas na TE que contribuem de forma direta ou indireta para a progressão dessa neoplasia, como por exemplo, favorecendo a coagulação e/ou inflamação e modulando a resposta imunológica. Também foi possível notar que mesmo após o tratamento o nível de microvesículas nestes pacientes está elevado, porém encontramos uma associação entre a diminuição do número de MVs com o aumento do tempo de tratamento, o que indica que o tratamento a longo prazo pode levar a normalização desse nível de MVs.

O trabalho possui limitações como o baixo número amostral, baixo número de pacientes que apresentaram eventos trombóticos e a coleta das amostras ter sido realizada em diferentes estágios da doença e graus de intensidade do tratamento.

Por esse motivo, são necessários mais estudos para avaliar o perfil das microvesículas circulantes nos pacientes com TE que tiveram eventos trombóticos em busca de um biomarcador que possa prever esses eventos e que essa coleta seja realizada em diferentes etapas como antes do tratamento, durante e com outros medicamentos como a anagrelida ou o ácido acetilsalicílico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sison, E. A. R. & Brown, P. The bone marrow microenvironment and leukemia: Biology and therapeutic targeting. *Expert Review of Hematology* vol. 4 271–283 Preprint at <https://doi.org/10.1586/ehm.11.30> (2011).
2. Korn, C. & Méndez-Ferrer, S. Myeloid malignancies and the microenvironment. *Blood* vol. 129 811–822 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-670224> (2017).
3. Khoury, J. D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* vol. 36 1703–1719 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1> (2022).
4. Ji, S. *et al.* Phagocytosis by endothelial cells inhibits procoagulant activity of platelets of essential thrombocythemia in vitro. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **18**, 222–233 (2020).
5. Hoffbrand, A. V, Higgs, D. R., Keeling, D. M. & Mehta, A. B. *Postgraduate Haematology*. (Wiley-Blackwell, 2016).
6. Tefferi, A., Vannucchi, A. M. & Barbui, T. Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J* **8**, (2018).
7. Loscocco, G. G., Guglielmelli, P. & Vannucchi, A. M. Impact of mutational profile on the management of myeloproliferative neoplasms: A short review of the emerging data. *OncoTargets and Therapy* vol. 13 12367–12382 Preprint at <https://doi.org/10.2147/OTT.S287944> (2020).
8. Ferrer-Marín, F., Cuenca-Zamora, E. J., Guijarro-Carrillo, P. J. & Teruel-Montoya, R. Emerging role of neutrophils in the thrombosis of chronic myeloproliferative neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 1–14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms22031143> (2021).
9. Longhitano, L. *et al.* The role of inflammation and inflammasome in myeloproliferative disease. *Journal of Clinical Medicine* vol. 9 1–11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm9082334> (2020).
10. Forte, D., Barone, M., Palandri, F. & Catani, L. The “vesicular intelligence” strategy of blood cancers. *Genes* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/genes12030416> (2021).
11. D’Souza-Schorey Crislyn, C. & Clancy, J. W. Tumor-derived microvesicles: Shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev* **26**, 1287–1299 (2012).
12. Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* **7**, (2018).
13. Ståhl, A. lie, Johansson, K., Mossberg, M., Kahn, R. & Karpman, D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatric Nephrology* vol. 34 11–30 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3816-z> (2019).
14. Nielsen, T., Kristensen, A. F., Pedersen, S., Christiansen, G. & Kristensen, S. R. Investigation of procoagulant activity in extracellular vesicles isolated by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* **7**, (2018).

15. Ed Rainger, G. *et al.* The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets* vol. 26 507–520 Preprint at <https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1064881> (2015).
16. Aharon, A., Rebibo-Sabbah, A., Tzoran, I. & Levin, C. Extracellular Vesicles in Hematological Disorders. *Rambam Maimonides Med J* **5**, e0032 (2014).
17. Boulais, P. E. & Frenette, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* **125**, 2621–2629 (2015).
18. Ho, Y. H. & Méndez-Ferrer, S. Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging. *Haematologica* vol. 105 38–46 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.211334> (2020).
19. Liggett, L. A. & Sankaran, V. G. Unraveling Hematopoiesis through the Lens of Genomics. *Cell* vol. 182 1384–1400 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.030> (2020).
20. Nann, D. & Fend, F. Synoptic diagnostics of myeloproliferative neoplasms: Morphology and molecular genetics. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
21. De Stefano, V. *et al.* Benefit-risk profile of cytoreductive drugs along with antiplatelet and antithrombotic therapy after transient ischemic attack or ischemic stroke in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J* **8**, (2018).
22. Geyer, H. L. *et al.* Associations between gender, disease features and symptom burden in patients with myeloproliferative neoplasms: An analysis by the MPN QOL international working group. *Haematologica* **102**, 85–93 (2017).
23. Bennett, J. H. Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Surg J* **64**, 413–423 (1845).
24. Kampen, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research* vol. 36 6–13 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.09.028> (2012).
25. Dameshek, W. Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes. *Blood* **6**, 372–375 (1951).
26. Nowell, P. C. The minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science (1979)* **132**, (1960).
27. Caspersson, T., Gahrton, G., Lindsten, J. & Zech, L. Identification of Philadelphia chromosome 239. *Exp Cell Res* **63**, 238–240 (1970).
28. Levine, R. L. *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387–397 (2005).
29. James, C. *et al.* James C., Ugo V., Le Couedic J.P., Staerk J., Delhommeau F., Lacout C. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434:1144–1148. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).
30. Kralovics, R. *et al.* A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *n engl j med* vol. 352 www.nejm.org (2005).
31. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365**, 1054–1061 (2005).

32. Yana Pikman, Y. *et al.* MPLW515LI is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS One* **3**, 1140–1151 (2006).
33. Scott, L. M. *et al.* JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *New England Journal of Medicine* **356**, 459–468 (2007).
34. Klampfl, T. *et al.* Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine* **369**, 2379–2390 (2013).
35. Nangalia, J. *et al.* Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *New England Journal of Medicine* **369**, 2391–2405 (2013).
36. Jaffe, E. S. & World Health Organization. *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. (IARC Press, 2001).
37. Campo, E., Swerdlow, S. & Jaffe, E. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019–5032 (2011).
38. Lim, K.-H. *et al.* Increased B cell activation is present in JAK2V617F-mutated, CALR-mutated and triple-negative essential thrombocythemia. *Oncotarget* vol. 8 www.impactjournals.com/oncotarget/ (2017).
39. Mehta, J., Wang, H., Iqbal, S. U. & Mesa, R. Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leuk Lymphoma* **55**, 595–600 (2014).
40. Hultcrantz, M. *et al.* Incidence of myeloproliferative neoplasms – trends by subgroup and age in a population-based study in Sweden. *J Intern Med* **287**, 448–454 (2020).
41. Robinson, A. J. & Godfrey, A. L. Low-Risk Essential Thrombocythemia: A Comprehensive Review. *HemaSphere* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000521> (2021).
42. Awada, H., Voso, M. T., Guglielmelli, P. & Gurnari, C. Essential thrombocythemia and acquired von willebrand syndrome: The shadowlands between thrombosis and bleeding. *Cancers* vol. 12 1–19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers12071746> (2020).
43. Michiels, J. J. *et al.* *Maedica-a Journal of Clinical Medicine PROGRESSES IN MEDICINE PROGRESSES IN MEDICINE 2016 WHO Clinical Molecular and Pathological Criteria for Classification and Staging of Myeloproliferative Neoplasms (MPN) Caused by MPN Driver Mutations in the JAK2, MPL and CALR Genes in the Context of New 2016 WHO Classification: Prognostic and Therapeutic Implications*. *Maedica A Journal of Clinical Medicine* vol. 11 (2016).
44. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* vol. 127 2391–2405 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544> (2016).
45. Swerdlow, S. *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. vol. 2 (2017).
46. Barbui, T. *et al.* Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: Revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia* vol. 32 1057–1069 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0077-1> (2018).
47. Torres, D. G. *et al.* JAK2 Variant Signaling: Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12020291> (2022).

48. Marín Oyarzún, C. P. *et al.* Platelet Toll-Like Receptors Mediate Thromboinflammatory Responses in Patients With Essential Thrombocythemia. *Front Immunol* **11**, (2020).
49. Owen, K. L., Brockwell, N. K. & Parker, B. S. Jak-stat signaling: A double-edged sword of immune regulation and cancer progression. *Cancers* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers11122002> (2019).
50. Greenfield, G., McMullin, M. F. & Mills, K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *Journal of Hematology and Oncology* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01116-z> (2021).
51. Gadomska, G. *et al.* Selected Parameters of Angiogenesis and the JAK2, CALR, and MPL Mutations in Patients With Essential Thrombocythemia. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* **24**, 1056–1060 (2018).
52. Bolkun, L. *et al.* A Proliferation-Inducing Ligand and B-Cell Activating Factor Are Upregulated in Patients with Essential Thrombocythemia. *J Clin Med* **11**, (2022).
53. Wang, Y. & Zuo, X. Cytokines frequently implicated in myeloproliferative neoplasms. *Cytokine: X* vol. 1 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cytox.2019.100005> (2019).
54. Jutzi, J. S. & Mullally, A. Remodeling the Bone Marrow Microenvironment – A Proposal for Targeting Pro-inflammatory Contributors in MPN. *Frontiers in Immunology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02093> (2020).
55. Ramanathan, G. & Fleischman, A. G. The Microenvironment in Myeloproliferative Neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of North America* vol. 35 205–216 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.11.003> (2021).
56. Cella, G. *et al.* Nitric oxide derivatives and soluble plasma selectins in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Haemost* **104**, 151–156 (2010).
57. Voukalis, C., Shantsila, E. & Lip, G. Y. H. Microparticles and cardiovascular diseases. *Annals of Medicine* vol. 51 193–223 Preprint at <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1609076> (2019).
58. Yates, A. G. *et al.* In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jev2.12151> (2022).
59. Clancy, J. W., Schmidtman, M. & D'Souza-Schorey, C. The ins and outs of microvesicles. *FASEB BioAdvances* vol. 3 399–406 Preprint at <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00127> (2021).
60. Zijlstra, A. & Di Vizio, D. Size matters in nanoscale communication. *Nat Cell Biol* **20**, 228–230 (2018).
61. Zhang, Q. *et al.* Transfer of Functional Cargo in Exomeres. *Cell Rep* **27**, 940-954.e6 (2019).
62. Lv, Y. M., Tan, J., Miao, Y. & Zhang, Q. The role of microvesicles and its active molecules in regulating cellular biology. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 23 7894–7904 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jcmm.14667> (2019).
63. Barteneva, N. S. *et al.* Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol* **14**, (2013).

64. Gurunathan, S., Kang, M. H., Qasim, M., Khan, K. & Kim, J. H. Biogenesis, membrane trafficking, functions, and next generation nanotherapeutics medicine of extracellular vesicles. *Int J Nanomedicine* **16**, 3357–3383 (2021).
65. Shu, Z., Tan, J., Miao, Y. & Zhang, Q. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 23 7933–7945 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jcmm.14716> (2019).
66. Kalra, H., Drummen, G. P. C. & Mathivanan, S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms17020170> (2016).
67. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology* vol. 113 1–11 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8> (2013).
68. Li, B., Antonyak, M. A., Zhang, J. & Cerione, R. A. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene* **31**, 4740–4749 (2012).
69. Latifkar, A., Hur, Y. H., Sanchez, J. C., Cerione, R. A. & Antonyak, M. A. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *Journal of Cell Science* vol. 132 Preprint at <https://doi.org/10.1242/JCS.222406> (2019).
70. Tricarico, C., Clancy, J. & D’Souza-Schorey, C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* vol. 8 220–232 Preprint at <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283> (2017).
71. Sheehan, C. & D’Souza-Schorey, C. Tumor-derived extracellular vesicles: Molecular parcels that enable regulation of the immune response in cancer. *Journal of Cell Science* vol. 132 Preprint at <https://doi.org/10.1242/jcs.235085> (2019).
72. Catoni, C., Di Paolo, V., Rossi, E., Quintieri, L. & Zamarchi, R. Cell-secreted vesicles: Novel opportunities in cancer diagnosis, monitoring and treatment. *Diagnostics* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/diagnostics11061118> (2021).
73. Tai, Y. L. *et al.* Basics and applications of tumor-derived extracellular vesicles. *Journal of Biomedical Science* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0533-x> (2019).
74. Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M. & Wakelam, M. J. O. Extracellular vesicles: Lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lipid Res* **59**, 1316–1324 (2018).
75. Teng, F. & Fussenegger, M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Advanced Science* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1002/advs.202003505> (2021).
76. Prada, I. & Meldolesi, J. Binding and fusion of extracellular vesicles to the plasma membrane of their cell targets. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
77. Crawford, L. B. Hematopoietic stem cells and betaherpesvirus latency. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1189805> (2023).
78. Aulakh, G. K. Lack of CD34 produces defects in platelets, microparticles, and lung inflammation. *Cell Tissue Res* **382**, 405–419 (2020).

79. Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S. & Hopkinson, A. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* vol. 32 1380–1389 Preprint at <https://doi.org/10.1002/stem.1661> (2014).
80. Nielsen, J. S. & McNagny, K. M. Erratum: Novel functions of the CD34 family (Journal of Cell Science (2008) vol. 121 (3683-3692)). *Journal of Cell Science* vol. 121 4145 Preprint at <https://doi.org/10.1242/jcs.03504> (2008).
81. Zhang, J. *et al.* Selective surface marker and miRNA profiles of CD34+ blast-derived microvesicles in chronic myelogenous leukemia. *Oncol Lett* **14**, 1866–1874 (2017).
82. Benyamine, A. *et al.* Increased serum levels of fractalkine and mobilisation of CD34+CD45- endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* **19**, (2017).
83. Sukriti, S. *et al.* Microvesicles in hepatic and peripheral vein can predict nonresponse to corticosteroid therapy in severe alcoholic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* **47**, 1151–1161 (2018).
84. Kiehstaller, S., Ottmann, C. & Hennig, S. MMP activation–associated aminopeptidase N reveals a bivalent 14-3-3 binding motif. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 18266–18275 (2020).
85. Petrovic, N. *et al.* CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. (2007) doi:10.1182/blood-2006.
86. Ghosh, M. *et al.* *C E L L B I O L O G Y* CD13 tethers the IQGAP1-ARF6-EFA6 complex to the plasma membrane to promote ARF6 activation, β 1 integrin recycling, and cell migration. *Sci. Signal* vol. 12 <http://stke.sciencemag.org/> (2019).
87. Matsumoto, H. *et al.* CLINICAL SIGNIFICANCE of TISSUE FACTOR and CD13 DOUBLEPOSITIVE MICROPARTICLES in SIRS PATIENTS with TRAUMA and SEVERE SEPSIS. *Shock* **47**, 409–415 (2017).
88. Gonzalez-Gil, A. & Schnaar, R. L. Siglec ligands. *Cells* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells10051260> (2021).
89. Godesi, S. *et al.* Small Molecule c-KIT Inhibitors for the Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumors: A Review on Synthesis, Design Strategies, and Structure–Activity Relationship (SAR). *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms24119450> (2023).
90. Szczepanski, M. J., Szajnik, M., Welsh, A., Whiteside, T. L. & Boyiadzis, M. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor- β 1. *Haematologica* **96**, 1302–1309 (2011).
91. Zinger, A. *et al.* Bioinspired extracellular vesicles: Lessons learned from nature for biomedicine and bioengineering. *Nanomaterials* vol. 10 1–23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano10112172> (2020).
92. Rahhal, R. & Seto, E. Emerging roles of histone modifications and HDACs in RNA splicing. *Nucleic Acids Res* **47**, 4911–4926 (2019).
93. Al Barashdi, M. A., Ali, A., McMullin, M. F. & Mills, K. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). *J Clin Pathol* **74**, 548–552 (2021).

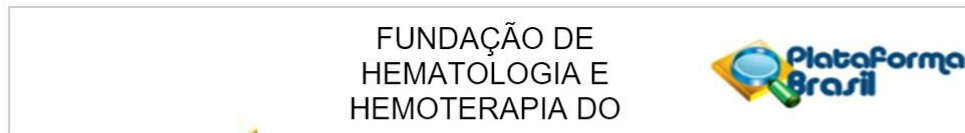
94. Coughlin, S. *et al.* An extracatalytic function of CD45 in B cells is mediated by CD22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E6515–E6524 (2015).
95. Steinman, R. M. & Inaba, K. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* **66**, 205–208 (1999).
96. Hou, L. *et al.* CD11c regulates neutrophil maturation. *Blood Adv* (2022) doi:10.1182/bloodadvances.2022007719.
97. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* vol. 116 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558> (2010).
98. Kelley, S. L., Lukk, T., Nair, S. K. & Tapping, R. I. The Crystal Structure of Human Soluble CD14 Reveals a Bent Solenoid with a Hydrophobic Amino-Terminal Pocket. *The Journal of Immunology* **190**, 1304–1311 (2013).
99. Skubitz, K. M., Campbell, K. D. & Skubitz, A. P. N. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol* **60**, 106–117 (1996).
100. Yoon, J., Terada, A. & Kita, H. CD66b Regulates Adhesion and Activation of Human Eosinophils. *The Journal of Immunology* **179**, 8454–8462 (2007).
101. Aroca, R. *et al.* Immunotherapy reduces allergen-mediated CD66b expression and myeloperoxidase levels on human neutrophils from allergic patients. *PLoS One* **9**, (2014).
102. Zhu, H. *et al.* CD16+ monocyte subset was enriched and functionally exacerbated in driving T-cell activation and B-cell response in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* **7**, (2016).
103. Tolbert, W. D. *et al.* Decoding human-macaque interspecies differences in Fc-effector functions: The structural basis for CD16-dependent effector function in Rhesus macaques. *Front Immunol* **13**, (2022).
104. Ueda, O. *et al.* Entire CD3 ϵ , δ , and η 3 humanized mouse to evaluate human CD3-mediated therapeutics. *Sci Rep* **7**, (2017).
105. Minguet, S., Swamy, M., Alarcón, B., Luescher, I. F. & Schamel, W. W. A. Full Activation of the T Cell Receptor Requires Both Clustering and Conformational Changes at CD3. *Immunity* **26**, 43–54 (2007).
106. Call, M. E., Pyrdol, J. & Wucherpfennig, K. W. Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* **23**, 2348–2357 (2004).
107. Walsh, A. J. *et al.* Classification of T-cell activation via autofluorescence lifetime imaging. *Nat Biomed Eng* **5**, 77–88 (2021).
108. Wang, K., Wei, G. & Liu, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* **1**, (2012).
109. Gehlert, C. L. *et al.* Dual Fc optimization to increase the cytotoxic activity of a CD19-targeting antibody. *Front Immunol* **13**, (2022).
110. Hammer, O. CD19 as an attractive target for antibody-based therapy. *mAbs* vol. 4 571–577 Preprint at <https://doi.org/10.4161/mabs.21338> (2012).
111. Majerciak, V. & Zheng, Z. M. Detection of viral RNA splicing in diagnostic virology. in *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* vol. 2 345–402 (Springer International Publishing, 2018).

112. Ziegler, S. *et al.* CD56 is a pathogen recognition receptor on human natural killer cells. *Sci Rep* **7**, (2017).
113. Gunesch, J. T. *et al.* CD56 regulates human NK cell cytotoxicity through Pyk2. *Elife* **9**, 1–28 (2020).
114. Delgado, A. V., Alexander, S. L., McManus, A. T. & Pusateri, A. E. Antibodies Against Human Cell Receptors, CD36, CD41a, and CD62P Crossreact with Porcine Platelets. *Cytometry B Clin Cytom* **56**, 62–67 (2003).
115. Słomka, A., Urban, S. K., Lukacs-Kornek, V., Żekanowska, E. & Kornek, M. Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Frontiers in Immunology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02723> (2018).
116. Pollet, H., Conrard, L., Cloos, A. S. & Tyteca, D. Plasma membrane lipid domains as platforms for vesicle biogenesis and shedding? *Biomolecules* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom8030094> (2018).
117. Karsten, U., Butschak, G., Stahn, R. & Goletz, S. A novel series of anti-human glycophorin A (CD235a) antibodies defining five extra- and intracellular epitopes. *Int Immunopharmacol* **10**, 1354–1360 (2010).
118. Jaskiewicz, E., Jodłowska, M., Kaczmarek, R. & Zerka, A. Erythrocyte glycophorins as receptors for Plasmodium merozoites. *Parasites and Vectors* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3575-8> (2019).
119. Giger, K., Habib, I., Ritchie, K. & Low, P. S. Diffusion of glycophorin A in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1858**, 2839–2845 (2016).
120. Letsiou, E. & Bauer, N. Endothelial Extracellular Vesicles in Pulmonary Function and Disease. in *Current Topics in Membranes* vol. 82 197–256 (Academic Press Inc., 2018).
121. György, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 68 2667–2688 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3> (2011).
122. Deng, F., Wang, S. & Zhang, L. Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of circulatory hypoxia-related diseases: a literature review. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 21 1698–1710 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jcmm.13125> (2017).
123. Xie, D. M. *et al.* CD51 distinguishes a subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells with distinct migratory potential: A novel cell-based strategy to treat acute myocardial infarction in mice. *Stem Cell Res Ther* **10**, (2019).
124. Li, B. *et al.* Overexpression of CD61 promotes hUC-MSC differentiation into male germ-like cells. *Cell Prolif* **49**, 36–47 (2016).
125. Cho, J. *et al.* Protein disulfide isomerase capture during thrombus formation in vivo depends on the presence of $\beta 3$ integrins. *Blood* **120**, 647–655 (2012).
126. Merle, N. S., Singh, P., Rahman, | Jubayer & Kemper, C. Integrins meet complement: The evolutionary tip of an iceberg orchestrating metabolism and immunity. *Br J Pharmacol* **178**, 2754–2770 (2021).

127. Caivano, A. *et al.* Extracellular vesicles in hematological malignancies: From biology to therapy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms18061183> (2017).
128. Rackov, G. *et al.* Vesicle-mediated control of cell function: The role of extracellular matrix and microenvironment. *Frontiers in Physiology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00651> (2018).
129. Aswad, M. H., Kissova, J., Ovesna, P., Rihova, L. & Penka, M. The clinical significance of circulating microparticles concerning thrombosis in BCR/ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *In Vivo (Brooklyn)* **35**, 3345–3353 (2021).
130. Charpentier, A. *et al.* Microparticle phenotypes are associated with driver mutations and distinct thrombotic risks in essential thrombocythemia. *Haematologica* vol. 101 e365–e368 Preprint at <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144279> (2016).
131. Trappenburg, M. C. *et al.* Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* **94**, 911–918 (2009).
132. Marchetti, M. *et al.* Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia. *Am J Hematol* **89**, 68–73 (2014).
133. Zhang, W. *et al.* Clinical significance of circulating microparticles in Ph- myeloproliferative neoplasms. *Oncol Lett* **14**, 2531–2536 (2017).
134. Piccin, A. *et al.* Observational retrospective study of vascular modulator changes during treatment in essential thrombocythemia. *Translational Research* **184**, 21–34 (2017).
135. Khalife, J., Sanchez, J. F. & Pichiorri, F. Extracellular Vesicles in Hematological Malignancies: From Biomarkers to Therapeutic Tools. *Diagnostics* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/diagnostics10121065> (2020).

7. ANEXOS

7.1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39991420.6.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.450.813

Apresentação do Projeto:

As Neoplasias Mieloproliferativas crônicas são doenças clonais causadas pela proliferação aberrante de células hematopoiéticas na medula óssea. Caracterizam-se por rearranjos genéticos cujos produtos atuam nas principais vias de transdução de sinais celulares (JAK/STAT, a via PI3K-AKT e proteínas da via MAPK) que conduzem a uma superprodução simples ou multilinear dos elementos eritróides, mielóides e megacariocíticos. Entre as neoplasias mieloproliferativas crônicas mais frequentes destacam: Leucemia Mielóide Crônica (BCR-ABL1 +), Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária; estas últimas classificadas como BCR-ABL.

As neoplasias mieloproliferativas crônicas representam um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula progenitora hematopoiética, sendo caracterizadas por proliferação elevada, mas com diferenciação e maturação relativamente preservadas.

Nos últimos anos, diversos estudos permitiram a descoberta das bases moleculares dessas doenças, que têm, em comum, a ativação constitutiva da tirosinoquinase decorrente de mutações adquiridas pela célula-tronco hematopoiética.

Sabe-se que a detecção de mutações nos genes JAK2, MPL e CARL e o conhecimento de fatores genético individuais podem contribuir para uma melhor avaliação prognóstica dos pacientes com NMC que, apesar de diagnóstico definido respondem de forma diferente durante o curso do tratamento. Assim, ao conhecer o background genético dos pacientes espera-se traçar um perfil

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

clínico baseadas nas variantes encontradas nesta população a fim de que biomarcadores moleculares sejam utilizados para ajudar a controlar o avanço da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar molecularmente pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mieloide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária (MP).

Objetivo Secundário:

- Rastrear a translocação BCR-ABL1 p210 mediante análise de transcritos b2a2 e b3a2;
- Determinar a frequência de mutações nos genes JAK2 (JAK2V617F, éxon 12), CALR (mutações éxon 9) e MPL (mutações éxon 10);
- Avaliar a presença simultânea da mutação BCR-ABL1 e JAK2V617F;
- Identificar o haplótipo do gene JAK2 (pesquisa do alelo G pelo SNP rs10974944);
- Avaliar a associação da presença do alelo G com a mutação V617F do gene JAK2;
- Associar as mutações nos genes JAK2, MPL e CALR com características clínicas e laboratoriais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos da pesquisa caracterizam-se por perda de amostras, de informações dos pacientes e quebra de sigilo. A fim de evitá-los, as amostras serão identificadas e armazenadas corretamente tornando-se viáveis para estudos futuros. Os dados pessoais dos participantes da pesquisa serão armazenados em planilha do software Microsoft Excel, acessível somente aos pesquisadores do estudo em estado de sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Benefícios:

Os benefícios da participação nesta investigação estão direcionados ao estudo molecular das neoplasias Mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas na população Amazonense, à compreensão de novos achados genéticos que geram grande impacto no manejo e tratamento destas malignidades hematológicas. Com isso, a realização desta pesquisa contribuirá à aquisição de ferramentas diagnósticas/prognósticas a favor da população alvo.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem delineado, metodologia coerente com objetivos e cronograma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de rosto anexada à PB;
- 2) Cartas de anuência anexadas à PB;
- 3) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido anexado à PB;
- 4) Instrumento da Pesquisa junto com o projeto anexado à PB;
- 5) Riscos: Anexados à PB;
- 6) Benefícios: Anexados à PB;
- 7) TCUD anexado à PB;
- 8) Currículo lattes do pesquisador responsável anexado à PB.
- 9) Cronograma: Adequado.

Recomendações:

Vide conclusões ou pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é importante para caracterizar molecularmente pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mieloide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária, sendo viável do ponto de vista ético e de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|-------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1658907.pdf | 04/12/2020 18:46:29 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEfinal.pdf | 04/12/2020 18:46:00 | ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ | Aceito |
| Outros | AndreaTarrago.pdf | 02/12/2020 18:05:17 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura | projeto.pdf | 09/11/2020 16:49:52 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

| | | | | |
|---|--------------------|------------------------|-------------------------------|--------|
| Investigador | projeto.pdf | 09/11/2020 16:49:52 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tcle.pdf | 09/11/2020 16:42:42 | ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ | Aceito |
| Outros | tcud.pdf | 09/11/2020 16:38:18 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | hemoam.pdf | 09/11/2020 16:35:37 | ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ | Aceito |
| Folha de Rosto | FOLHA_DE_ROSTO.pdf | 09/11/2020 16:29:12 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Outros | labgen.pdf | 09/11/2020 16:23:30 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Outros | SAME.pdf | 09/11/2020 16:23:05 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Emanuela.pdf | 09/11/2020 16:20:31 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Lucivana.pdf | 09/11/2020 16:20:05 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Wanessa.pdf | 09/11/2020 16:17:36 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Nelson.pdf | 09/11/2020 16:17:18 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Dania.pdf | 09/11/2020 16:16:56 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Miliane.pdf | 06/11/2020 18:14:02 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Juliana.pdf | 06/11/2020 18:13:26 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Adriana.pdf | 06/11/2020 18:12:50 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Allyson.pdf | 06/11/2020 18:12:19 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Andrea.pdf | 06/11/2020 18:12:01 | ANDRÉA MONTEIRO | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

MANAUS, 09 de Dezembro de 2020

Assinado por:
SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

7.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) Conforme Resolução N° 466/12 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

O presente documento visa convidá-lo para participar no projeto de pesquisa que tem por título: “**Caracterização molecular de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas**”, sendo a pesquisadora responsável: Dra. Andréa M. Tarragô e colaboradores. Assim, o estudo tem como objetivo caracterizar as alterações genéticas que estão presentes em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mielóide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária (MP).

JUSTIFICATIVA: Mediante da sua participação nesta pesquisa, a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia de Amazonas- HEMOAM permitirá oferecer ferramentas no diagnóstico/prognóstico em pacientes que sejam atendidos na Fundação com doenças no sangue chamadas neoplasias mieloproliferativas crônicas. Assim como compreender novos conhecimentos que provocam grande impacto no acompanhamento do tratamento destas doenças. No Estado de Amazonas não existem pesquisas sobre estudo molecular de Neoplasias Mieloproliferativas crônicas, que identifiquem alterações em genes denominados *JAK2*, *MPL* e *CALR*, importantes no desenvolvimento de doenças no sangue (neoplasias mieloproliferativas crônicas). O estudo proposto abrange seres humanos; portanto envolve certos riscos/ desconfortos e benefícios, os quais são apresentados a seguir:

RISCOS E DESCONFORTOS: Sua participação nesta pesquisa não está associada a nenhum tipo de risco, os únicos desconfortos estão associados ao processo de coleta do sangue, manifestando uma possível aparição de hematoma, sangramento no sítio de punção, ardor causado pelo álcool, lesão de nervo (raramente), náuseas, vômitos ou desmaios. Ressalta-se que a equipe de coleta de amostras é altamente qualificada, os quais possuem manuais e treinamentos para identificar e tratar reações que possam surgir durante ou após extração do sangue.

BENEFÍCIOS: Os benefícios indiretos da sua participação nesta investigação estão direcionados ao estudo molecular (material genético) de doenças no sangue chamadas neoplasias Mieloproliferativas crônicas na população Amazonense e à aquisição de novos conhecimentos que provocam grande impacto no monitoramento e tratamento destas doenças. Com isso, a realização desta pesquisa contribuirá à aplicação de ferramentas diagnósticas/prognósticas a favor da população em estudo; não originando nenhum tipo de benefício direto ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes desta pesquisa.

Em caso de você aceitar participar do estudo, serão realizados os seguintes procedimentos:

PROCEDIMENTO DE COLETA DO SANGUE/ ANÁLISE LABORATORIAL: Será extraída uma amostra de sangue, limpando o sítio de punção com algodão e álcool, empregando agulhas e tubos plásticos novos e estéreis. As amostras do sangue serão coletadas em quatro tubos (um com tampa azul, um com tampa amarela e dois com tampa roxa), utilizando um volume de sangue acorde às indicações do fabricante. Ao finalizar a punção, a amostra se armazenará em condições ótimas até sua análise laboratorial.

REVISAO DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS: Serão revisados os seus prontuários médicos tanto nos arquivos físicos como nos arquivos digitais (arquivos armazenados no sistema do HEMOAM) para obtenção de dados clínicos como Sexo, Idade, diagnóstico (CID= Código estabelecido para uma determinada doença) resposta ao tratamento e quadro clínico manifestado.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: Se você sofrer algum dano ou intercorrência, deverá falar para alguém da equipe da pesquisa imediatamente ou em caso de emergência, poderá contactar diretamente Dra. Andréa Monteiro Tarragô, pesquisadora responsável pelo estudo, através do telefone (92) 99136-0001 ou por e-mail andrea_s_monteiro@hotmail.com. Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar e do seu acompanhante. A equipe da pesquisa irá garantir que você receba assistência imediata para reparação a dano (caso tenha quaisquer tipos de danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios), sofridos no decorrer de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento.

Após conhecer os procedimentos que serão realizados para desenvolver o estudo, você deverá saber o seguinte:

VOLUNTARIEDADE: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você tem o direito a recusar-se a participar ou retirar-se do estudo em qualquer momento, sim que esta decisão afete a qualidade de atendimento médico (ou de outra índole) no HEMOAM. Cabe mencionar, que você não perderá nenhum direito legal por assinar este documento.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os seus dados pessoais referentes à participação neste estudo permanecerão confidenciais durante o desenvolvimento da pesquisa toda, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade. Assim mesmo, os dados obtidos de testes realizados poderão ser utilizados de forma anônima para publicações científicas ou ser apresentados em uma reunião científica. Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); e-mail: cephemoam@gmail.com; endereço: na Av. Constantino Nery, 4397-Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13 (CEP-HEMOAM), Chapada, Manaus - AM; telefone: (92) 3655-0114. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e solicitamos a sua autorização para armazenamento de material para estudos futuros. Garantimos que toda nova pesquisa a ser realizada utilizando as amostras armazenadas será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da FHEMOAM e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Desta forma, o Sr. (a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras relacionadas com o estudo de alterações genéticas que desenvolvem doenças no sangue?

() Sim ou () Não

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do participante)



(Assinatura do pesquisador)

(Impressão dactiloscópica)

Manaus, ____ / ____ / ____

