UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Alterações da expressão de apoptomirs, de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticos em Mielofibrose e Trombocitemia Essencial

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de **Doutor em Ciências**.

Área de Concentração Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado(a): Raquel Tognon-Ribeiro

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Fabíola Attié de Castro.

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

Ribeirão Preto
2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Tognon-Ribeiro, Raquel

Alterações da expressão de apoptomirs, de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticos em Mielofibrose e Trombocitemia Essencial, Ribeirão Preto, 2011.

171 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicada à Farmácia.

Orientador: Castro, Fabíola Attié.

1. Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas. 2. Apoptose. 3. Mielofibrose. 4. Trombocitemia Essencial 5. Expressão Gênica. 6. microRNA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raquel Tognon Ribeiro

Alterações da expressão de apoptomirs, de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticos em Mielofibrose e Trombocitemia Essencial

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de **Doutor em Ciências**.

Área de Concentração Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Fabíola Attié de Castro.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese

Ao meu pai, por ter me mostrado os melhores caminhos a seguir com tamanho amor, por ter me provido os meios para fazê-lo, por ter segurado a minha mão para que eu não me desequilibrasse; pelas grandes discussões filosóficas e até mesmo científicas que me ajudaram a enxergar a vida e a ciência de um modo muito mais amplo.

À minha mãe, por todo companheirismo, amor, proteção e confiança que foram fundamentais para que completasse mais essa jornada.

Ao meu irmão, por ter me ensinado tão carinhosamente valores de vida essenciais para ser perseverante nos meus trabalhos sempre com um “objetivo maior”.

Ao meu marido, por estar sempre ao meu lado e ser compreensivo em todos os momentos.

Agradecimentos

À Deus, por me dar forças, por iluminar meus caminhos, por colocar pessoas especiais nesse caminho, por me permitir realizar esse trabalho;

À Professora Fabíola Attié de Castro, pela oportunidade e confiança, pelos ensinamentos e amizade;

Aos pacientes, pela colaboração essencial para o desenvolvimento desse projeto e pelas lições de vida;

À Professora Ana Maria de Souza, pelo apoio e colaborações;

Às funcionárias do laboratório de Hematologia da FCFRP, Zita, Solange, Zelma, Jennifer e Luciana pela ajuda no desenvolvimento do projeto;

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto, na pessoa do Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, por permitir que parte desse trabalho fosse realizada em suas instalações;

À Dra. Simone Kashima, do Hemocentro de Ribeirão Preto, por colaborar com este estudo e permitir que parte dos experimentos fosse realizada em seu laboratório de Biologia Molecular;

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial às técnicas Evandra, Rochelle e Vírginia pela assistência;

À Fabiana Rossetto de Moraes, do laboratório de citometria de fluxo da FCFRP-USP pela colaboração;

À Patrícia Palma e Camila, do laboratório de citometria de fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela colaboração;

Às colegas de laboratório Elaine, Aline, Sandra, Natália e Lívia pela imensa colaboração e companheirismo;

Às amigas Tathiane, Mirian, Marcella, Tatiane, Julise e Cristiane pelo apoio incondicional;

Aos docentes, funcionários e alunos do laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP pela colaboração e permissão para utilização dos aparelhos e laboratório para o desenvolvimento do estudo;

À equipe do laboratório do Professor Marcello Dias Baruffi pela colaboração, em especial Lilian Cataldi Rodrigues e Marlise B. Agostinho Montes;

Aos médicos hematologistas Belinda P. Simões, Carlos Velano, Maria Aparecida Zanichelli, Mary Santana e Elizabeth X. Souto por colaborar na seleção dos pacientes e coleta de material para estudo;

À FAPESP (Proc. No. 2008/54387-5 e 06/50094-8) e CNPq (132297/2007-8) pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

Agradeço à FAPESP (Processo Número 2008/54387-5 e 06/50094-8) pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein).

RESUMO

TOGNON-RIBEIRO, RAQUEL. Alterações da expressão de apoptomirs, de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticos em Mielofibrose e Trombocitemia Essencial. 2011. 171f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

As Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas (NMPC) – Trombocitemia Essencial (TE), Mielofibrose (MF) - são desordens hematopoéticas resultantes da expansão clonal da célula tronco hematopoética alterada. Essas doenças caracterizam-se pela independência dos progenitores hematopoéticos aos estímulos dos fatores de crescimento e citocinas e pela proliferação exacerbada das células da linhagem mielóide com maturação preservada. Os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patogênese e progressão da TE e MF não foram ainda esclarecidos, mas o mieloacúmulo presente nessas doenças parece estar associado à alteração de proliferação e apoptose celular. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar em células CD34⁺ da medula óssea e leucócitos dos pacientes com TE e MF: (1) a expressão de apoptomirs e de genes pró- e anti-apoptóticos pertencentes à via intrínseca e extrínseca da apoptose pela metodologia de RT-PCR em tempo real; (2) expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas por *Western-blot*; (3) o perfil de sensibilidade das células mononucleares à apoptose induzida por diferentes agentes apoptogênicos pela técnica de citometria de fluxo e (4) correlacionar os resultados obtidos com dados clínico-laboratoriais dos pacientes e com a expressão do gene *PRV-1*. Em TE, nas células CD34⁺, foi detectado aumento da expressão de *a1*, *mcl-1*, *bid*, *bok* e *nox* e diminuição de *bax* em relação aos controles. Nos leucócitos, foi detectada a elevação da expressão de *a1*, *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-x_L*, *bad* e *bok* e diminuição de *bid* e *bim_{EL}*. Em comparação com o grupo controle, os pacientes com MF apresentaram maior expressão dos genes *a1*, *bcl-w*, *bak*, *bok* e *nox* e menor de *bcl-2* nas células CD34⁺. Nos leucócitos dos pacientes com MF foi verificado aumento da expressão dos genes *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-x_L*, *bad* e *bok*. O *c-iap-1* apresentou maior expressão nas células CD34⁺ dos pacientes com MF e TE, enquanto que o *c-iap-2* estava elevado nos leucócitos e células CD34⁺. Foi ainda detectada a expressão diferencial em TE e MF dos genes pertencentes a via de receptor de morte, como a maior expressão dos genes *fas*, *fas-L*, *faim* e *dr4* nas células CD34⁺ dos pacientes e menor expressão do *fas-L* e *trail* nos leucócitos dos pacientes com TE e MF. Os resultados indicaram associação da expressão do gene *PRV-1* com a mutação JAK2V617F e com a expressão dos genes *a1*, *bcl-w*, *bik*, *bax*, *c-iap-2* e *trail*. Com relação à expressão proteica, BCL-X_L estava aumentada e TRAIL diminuída em leucócitos de pacientes com MF enquanto que a molécula BID estava diminuída em leucócitos de pacientes com TE. Os miRNA26a, let 7d e miR15a estavam mais expressos nos leucócitos de pacientes com TE e MF. Em pacientes com TE o miR130b estava elevado e o miR16 diminuído, enquanto que nos pacientes com MF o miR198 estava aumentado. Os linfócitos dos pacientes com TE e MF apresentaram maior resistência à apoptose estimulada por: actinomicina, etoposídeo, teniposídeo, citarabina e estaurosporina do que os linfócitos dos controles. Em conclusão, os dados obtidos sugerem a ligação da alteração do processo de apoptose celular, com a expressão do gene *PRV-1* e status da mutação JAK2V617F. Esses resultados contribuem para o melhor entendimento da fisiopatologia das NMPC visto que associam a fisiopatologia da TE e MF com a resistência das células alteradas à apoptose. Essas informações serão úteis no futuro, possibilitando o desenho de novos alvos terapêuticos e a descrição de novos marcadores de prognóstico.

Palavras-chave: 1. Neoplasias Mieloproliferativas. 2. Apoptose. 3. Mielofibrose. 4. Trombocitemia Essencial 5. Expressão Gênica. 6. microRNA.

ABSTRACT

TOGNON-RIBEIRO, RAQUEL. Deregulated expression of apoptomirs and apoptosis-related genes and proteins in Primary Myelofibrosis and Essential Thrombocythemia. 2011. 171f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Chronic Myeloproliferative Neoplasms (cMPN) - Essential Thrombocythemia (ET), Primary Myelofibrosis (PMF) and Polycythemia Vera (PV) - are clonal hematopoietic stem cell malignancies characterized by an accumulation of mature myeloid cells in bone marrow and peripheral blood. It seems that apoptotic machinery deregulation contribute to ET and PMF pathogenesis. Despite the advances in the molecular knowledge, the physiopathology of these diseases remains unknown. This study investigated cellular and molecular mechanisms involved in apoptosis process regulation in bone marrow haematopoietic progenitor CD34⁺ cells and leukocytes from ET and PMF patients. The specific aims were: (1) to evaluate death receptor's family members and Bcl-2 related genes expression as well apoptosis-related microRNAs by Real Time PCR; (2) apoptosis-related protein expression by *Western Blot*; (3) access mononuclear cells apoptosis resistance by flow cytometry and (4) to correlate the results with JAK2V617F mutation, PRV-1 gene expression and as well clinical data. In ET CD34⁺ cells, we found overexpression of *a1*, *mcl-1*, *bid*, *bok* e *noxa* and a decrease of *bax* compared to controls, while in leukocytes *a1*, *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-x_L*, *bad* e *bok* expression was increased and *bid* and *bim_{EL}* expression was lower than in controls. In PMF, *a1*, *bcl-w*, *bak*, *bok* e *noxa* were overexpressed and *bcl-2* downregulated in CD34⁺ cells. In PMF leukocytes *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-x_L*, *bad* e *bok* mRNA levels were increased. *c-iap-1* was increased in ET and PMF CD34⁺ cells and *c-iap-2* expression elevated in ET and PMF CD34⁺ cells and leukocytes. Death receptor related genes showed overexpression of *fas*, *fas-L*, *faim* and *dr4* in patients' CD34⁺ cells and downregulation of *fas-L* and *trail* in ET and PMF leukocytes. We found differential expression of several genes between patients JAK2V617F positive and negative, as well we found correlation between gene expression and JAK2V617F allele burden, white blood cells and platelets count and splenomegaly. *PRV-1* gene was overexpressed in ET and PMF leukocytes and showed correlation with JAK2V617F mutation and *a1*, *bcl-w*, *bik*, *bax*, *c-iap-2* and *trail* gene expression. Regarding protein expression, BCL-X_L was increased and TRAIL decreased in PMF leukocytes and BID was decreased in ET leukocytes. miRNA26a, let 7d e miR15a was overexpressed in ET and PMF leukocytes, while miR130b was increased only in ET and miR198 only in PMF. miR16 was downregulated in ET leukocytes comparing to controls. We also detected a resistance to apoptosis-inducers in ET and PMF lymphocytes and we observed correlation between apoptosis percentage and the expression of many studied genes. In conclusion, the results indicate the participations of Bcl-2 family genes and Death Receptor pathway genes, as well *PRV-1* and JAK2V617F mutation in these disorders, which contribute to elucidate cMPN physiopathology and might lead to the discovery of new cMPN therapies and molecular markers.

Keywords: 1. Myeloproliferative Neoplasms. 2. Apoptosis. 3. Myelofibrosis. 4. Essential Thrombocythemia. 5. Gene Expression. 6. microRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização de JAK-2 e a mutação V617F em Doenças Mieloproliferativas Crônicas, adaptado de Levine, 2007.	35
Figura 2. Via extrínseca da apoptose celular, adaptada de Jin; El-Deiry, 2005.	38
Figura 3. Via Intrínseca da apoptose adaptada de Jin; El-Deiry, 2005.	39
Figura 4. Processamento do miRNA (adaptado de Beezhold; Castranova; Chen, 2010).	44
Figura 5. Exemplo de gel de agarose 1% com RNA extraídos de amostras de sangue periférico de pacientes e controles. Observa-se a visualização das bandas 28S, 18S e 5S do RNA.	56
Figura 6. Expressão diferencial dos genes <i>a1</i> , <i>mcl-1</i> , <i>bid</i> , <i>bik</i> , <i>bax</i> , <i>bcl-w</i> , <i>bak</i> , <i>bok</i> e <i>nox</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	77
Figura 7. Expressão dos genes <i>bcl-x_L</i> , <i>bad</i> e <i>bim_{EL}</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com TE e MF. Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0.05$). As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	78
Figura 8. Expressão dos genes <i>c-iap-1</i> , <i>c-iap-2</i> , <i>XIAP</i> e <i>survivina</i> em células CD34 ⁺ de indivíduos do grupo controle e de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	79
Figura 9. Expressão diferencial dos genes <i>fas</i> , <i>fas-L</i> , <i>dr4</i> , <i>faim</i> e <i>c-flip</i> em células CD34 ⁺ de indivíduos do grupo controle e de pacientes com TE e MF.	80
Figura 10. Expressão dos genes <i>trail</i> e <i>dr5</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com TE e MF. Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0.05$). As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	81
Figura 11. Expressão diferencial dos genes <i>a1</i> , <i>mcl-1</i> , <i>bcl-2</i> , <i>bcl-x_L</i> , <i>bcl-w</i> , <i>bad</i> , <i>bid</i> , <i>bim_{EL}</i> , e <i>bok</i> em leucócitos de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	87
Figura 12. Expressão diferencial dos genes <i>mcl-1</i> , <i>bak</i> , <i>bik</i> e <i>nox</i> em leucócitos de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	87
Figura 13. Expressão dos genes <i>c-iap-1</i> , <i>c-iap-2</i> , <i>XIAP</i> e <i>survivina</i> em leucócitos de sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	89
Figura 14. Expressão dos genes <i>trail</i> , <i>fas-L</i> e <i>dr4</i> em leucócitos de sangue periférico do grupo controle e de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	90
Figura 15. Expressão dos genes <i>fas</i> , <i>faim</i> , <i>c-flip</i> e <i>dr5</i> em leucócitos de sangue periférico do grupo controle e de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	91
Figura 16. Expressão do gene <i>PRV-1</i> em células CD34 ⁺ e em leucócitos dos grupos controle, TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	92
Figura 17. Correlação entre a expressão do gene <i>PRV-1</i> e de genes relacionados à apoptose em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial e Mielofibrose.	93

Figura 18. Expressão diferencial entre JAK2V617F positivos e negativos dos genes <i>al</i> , <i>mcl-1</i> e <i>bid</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com MF; dos genes <i>bik</i> e <i>noxa</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com TE e dos genes <i>bad</i> e <i>bax</i> em leucócitos de pacientes com TE. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	94
Figura 19. Expressão diferencial entre JAK2V617F positivos e negativos do gene <i>c-iap-2</i> , <i>faim</i> , <i>fas</i> e <i>dr4</i> em células CD34 ⁺ e leucócitos de pacientes com MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.	95
Figura 20. Correlação entre a expressão dos genes <i>al</i> , <i>mcl-1</i> , <i>bid</i> , <i>noxa</i> , <i>bad</i> e <i>bax</i> e a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F.	96
Figura 21. Correlação entre a expressão dos genes <i>c-iap-2</i> , <i>faim</i> e <i>fas</i> e a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F.....	96
Figura 22. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F e a contagem de leucócitos dos pacientes com TE.	97
Figura 23. Correlação entre a expressão dos genes <i>bad</i> e <i>bak</i> e a concentração de hemoglobina (Hb) e o Hematócrito (Ht) em pacientes com Mielofibrose Primária.	98
Figura 24. Correlação entre a expressão dos genes anti-apoptóticos <i>mcl-1</i> , <i>noxa</i> , <i>bad</i> e <i>c-flip</i> e a contagem de leucócitos dos pacientes com TE.	99
Figura 25. Correlação entre a expressão dos genes <i>c-iap-2</i> e <i>faim</i> em células CD34 ⁺ de pacientes com TE e a contagem de leucócitos desses pacientes.	99
Figura 26. Correlação entre a expressão dos genes anti-apoptóticos <i>al</i> , <i>mcl-1</i> , <i>bcl-w</i> , <i>bcl-x_L</i> e <i>c-flip</i> e a contagem de plaquetas.	100
Figura 27. Correlação entre a expressão dos genes anti-apoptóticos <i>c-iap-2</i> , <i>survivina</i> e <i>XIAP</i> e a contagem de plaquetas.....	101
Figura 28. Correlação entre a expressão dos genes pró-apoptóticos <i>bak</i> , <i>bid</i> , <i>bim_{EL}</i> e <i>bok</i> e a contagem de plaquetas.....	101
Figura 29. Correlação entre a expressão dos genes anti-apoptóticos <i>bcl-2</i> , <i>bcl-x_L</i> , <i>c-iap-2</i> , <i>XIAP</i> , <i>survivina</i> e <i>faim</i> e esplenomegalia (aumento do baço em centímetros) nos pacientes com TE.	102
Figura 30. Correlação entre a expressão dos genes pró-apoptóticos <i>bax</i> e <i>bik</i> e esplenomegalia (aumento do baço em centímetros) nos pacientes com TE.	103
Figura 31. Correlação entre a expressão dos genes pró-apoptóticos <i>bim_{EL}</i> , <i>bik</i> , <i>bok</i> e <i>noxa</i> e esplenomegalia (aumento do baço em centímetros) nos pacientes com TE.	103
Figura 32. Correlação entre a expressão dos genes da via extrínseca e esplenomegalia (aumento do baço em centímetros) nos pacientes com TE.	104
Figura 33. Comparação da expressão do gene <i>PRV-1</i> nos leucócitos de pacientes positivos e negativos para a mutação JAK2V617F e correlação com a porcentagem de alelos mutados.	105
Figura 34. Correlação da expressão do gene <i>PRV-1</i> e a contagem de leucócitos em pacientes com Mielofibrose.....	106
Figura 35. Correlação da expressão do gene <i>PRV-1</i> e a contagem de plaquetas e esplenomegalia em pacientes com Trombocitemia Essencial e Mielofibrose.	107

Figura 36. Porcentagem de apoptose (positividade para Anexina-V FITC) induzida por (A) ACT 1 uM e (B) ACT 5 uM, (C) CHX 50 uM, (D) VP16 25 uM, (E) ARA-C 25 uM, (F) STS 0,1 e 0,5 uM e (G) VM26 25 uM em linfócitos de indivíduos dos grupos controle, TE e MF, determinada por citometria de fluxo.....	109
Figura 37. Correlação entre expressão dos genes <i>bik</i> , <i>nox</i> , <i>trail</i> e <i>faim</i> em células CD34 ⁺ e a porcentagem de apoptose induzida por citarabina (ARA-C), estaurosporina (STS) e etoposídeo (VP-16).	110
Figura 38. Correlação entre expressão dos genes <i>al</i> e <i>mcl-1</i> em leucócitos e a porcentagem de apoptose induzida por actinomicina (ACT) e estaurosporina (STS).....	110
Figura 39. Correlação positiva entre expressão dos genes pró-apoptóticos <i>bad</i> , <i>bid</i> , <i>bik</i> e <i>bim_{EL}</i> em leucócitos e a porcentagem de apoptose induzida por actinomicina (ACT) e estaurosporina (STS).....	111
Figura 40. Correlação positiva entre expressão dos genes <i>fas-L</i> e <i>dr4</i> em leucócitos e a porcentagem de apoptose induzida por citarabina (ARA-C), actinomicina (ACT) e etoposídeo (VP16).	112
Figura 41. Correlação positiva entre expressão do gene <i>survivina</i> em leucócitos e a porcentagem de apoptose induzida por actinomicina (ACT).....	112
Figura 42. Correlação negativa entre a expressão do gene <i>PRV-1</i> e a porcentagem de apoptose.....	113
Figura 43. Detecção da proteína Bcl-x _L em leucócitos de pacientes com Mielofibrose.	114
Figura 44. Detecção da proteína Bcl-2 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.	115
Figura 45. Detecção da proteína BID em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.	116
Figura 46. Detecção da proteína Mcl-1 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose.	117
Figura 47. Detecção da proteína C-IAP-1 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose. ...	117
Figura 48. Detecção da proteína TRAIL em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.	118
Figura 49. Detecção da proteína C-FLIP em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial.....	118
Figura 50. Detecção da expressão do FAS e FAS-L em células mononucleares de pacientes por citometria de fluxo.....	119
Figura 51. Expressão de microRNA em leucócitos de TE, MF e controles.	121
Figura 52. Correlação entre a expressão dos microRNA miR15a e mir198 e a mutação JAK2V617F em pacientes com Mielofibrose.	122
Figura 53. Correlação entre a expressão dos microRNAs miR26a, miR130b, miR29c e mir21 e genes alvo em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.....	123
Figura 54. Correlação entre a expressão dos microRNAs miR15 e miR16 e genes alvo em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das Neoplasias Mielóides de acordo com a OMS.....	22
Tabela 2. Critérios utilizados para o diagnóstico da Mielofibrose Primária, de acordo com as definições da Organização Mundial da Saúde em 2008.	24
Tabela 3. Critérios utilizados para o diagnóstico da Trombocitemia Essencial, de acordo com as definições da Organização Mundial da Saúde em 2008.	28
Tabela 4. Características demográficas dos pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.....	50
Tabela 5. Características demográficas dos doadores de medulas ósseas do grupo controle (MOC).	51
Tabela 6. Características demográficas dos doadores saudáveis de sangue periférico do grupo controle (SPC).	52
Tabela 7. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos cDNAs das moléculas envolvidas na apoptose celular, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento (TA).	57
Tabela 8. Padronizações das reações de amplificação dos genes propostos no projeto, ciclo padronizado no aparelho de PCR em tempo real, concentração utilizada dos oligonucleotídeos (primer) e a linhagem que foi empregada durante a padronização do ensaio.	59
Tabela 9. Anticorpos utilizados nos ensaios de <i>Western Blot</i>	62
Tabela 10. MicroRNAs e genes alvos.....	65
Tabela 11. Número e pureza das células CD34 ⁺ , dos controles pós-separação por coluna imunomagnética.....	67
Tabela 12. Número e pureza das células CD34 ⁺ da medula óssea dos pacientes (MOP) com Mielofibrose Primária (MF) e Trombocitemia Essencial (TE), obtidas por separação em coluna imunomagnética.....	68
Tabela 13. Porcentagem de alelos mutados JAK2 V617F, parâmetros hematológicos e tamanho do baço dos pacientes com Mielofibrose Primária e Trombocitemia Essencial.	70
Tabela 14. Valores de Ct dos “housekeeping genes” <i>β-actina</i> e <i>gapdh</i> em células CD34 ⁺ dos controles.	73
Tabela 15. - Valores de Ct dos “housekeeping genes <i>β-actina</i> e <i>gapdh</i> ” em células CD34 ⁺ da medula óssea dos pacientes com Mielofibrose Primária (MF) e Trombocitemia Essencial (TE).	74
Tabela 16. Medianas dos 2 ^{-ΔΔCt} referentes à expressão dos genes <i>a1</i> , <i>mcl-1</i> , <i>bcl-2</i> , <i>bcl-w</i> , <i>bcl-x_L</i> em células CD34 ⁺ dos grupos MOC, TE e MF.	75
Tabela 17. Medianas dos 2 ^{-ΔΔCt} referentes à expressão dos genes <i>bax</i> , <i>bad</i> , <i>bak</i> , <i>bid</i> , <i>bik</i> , <i>bim_{EL}</i> , <i>bok</i> e <i>noxa</i> em células CD34 ⁺ do grupo controle e de pacientes com TE e MF.....	76
Tabela 18. Medianas dos 2 ^{-ΔΔCt} obtidos referentes à expressão dos genes <i>c-iap-1</i> , <i>c-iap-2</i> , <i>XIAP</i> e <i>Survivina</i> em células CD34 ⁺ do grupo controle e de pacientes com TE e MF.	78
Tabela 19. Medianas dos 2 ^{-ΔΔCt} obtidos referentes à expressão dos genes <i>fas</i> , <i>fas-L</i> , <i>faim</i> , <i>c-flip</i> , <i>trail</i> , <i>dr4</i> e <i>dr5</i> em células CD34 ⁺ do grupo controle e de pacientes com TE e MF.	80

Tabela 20. Ct do housekeeping gene β -actina e gapdh médio para leucócitos do sangue periférico do grupo controle.	82
Tabela 21. Valores de Ct dos housekeeping genes β -actina e gapdh para os leucócitos do sangue periférico dos pacientes com Mielofibrose Primária e Trombocitemia Essencial.....	84
Tabela 22. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos referentes à expressão dos genes <i>a1</i> , <i>mcl-1</i> , <i>bcl-2</i> , <i>bcl-w</i> , <i>bcl-x_L</i> em leucócitos de sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes com TE e MF.....	86
Tabela 23. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dos genes pró-apoptóticos <i>bax</i> , <i>bad</i> , <i>bak</i> , <i>bid</i> , <i>bik</i> , <i>bim_{EL}</i> , <i>bok</i> e <i>nox</i> a e o nível de significância (p) referente à comparação da expressão gênica dos leucócitos dos controles e pacientes com TE e MF.	86
Tabela 24. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dos genes <i>c-iap-1</i> e <i>c-iap-2</i> e o nível de significância (p) referente à comparação dos valores da expressão gênica dos leucócitos do sangue periférico dos indivíduos do grupo controle e pacientes com TE e MF.	88
Tabela 25. Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos para os genes <i>fas</i> , <i>fas-L</i> , <i>faim</i> , <i>c-flip</i> , <i>trail</i> , <i>dr4</i> e <i>dr5</i> em leucócitos do sangue periférico de pacientes e controles.	90
Tabela 26. Valores das medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos para o gene PRV-1 em pacientes e controles.	91
Tabela 27. Medianas das porcentagens de apoptose dos linfócitos dos grupos controle e de pacientes com TE e MF.....	108
Tabela 28. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos referentes à expressão dos miRNA em leucócitos de TE e MF.....	120
Tabela 29. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos referentes à expressão dos miRNA em leucócitos de TE e MF.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD –	solução de ácido cítrico, citrato, dextrose
AIF –	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
AKT –	<i>Serine/threonine-specific protein kinase</i>
APAF-1 –	<i>Apoptosis protease-activator factor 1</i>
<i>bad</i> –	<i>bcl-2 antagonist of the cell death</i>
<i>bak</i> –	<i>bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
<i>bax</i> –	<i>bcl-2 associated X protein</i>
<i>bcl-x</i> –	<i>bcl-2 related gene</i>
<i>bcl-w</i> –	<i>Anti-apoptotic bcl-2 family member</i>
<i>bcl-2</i> –	<i>B-cell CLL / lymphoma 2</i>
<i>bcr-abl1</i> –	<i>break cluster region - Abelson</i>
bFGF –	<i>basic fibroblastic growth factor</i>
BH domain –	<i>bcl-2 homology domain</i>
<i>bid</i> –	<i>BH3-interacting domain agonist</i>
<i>bik</i> –	<i>bcl-2-interacting killer</i>
<i>bim</i> –	<i>bcl-2-interacting mediator</i>
<i>bim_{EL}</i> –	<i>bcl-2-like 11 (apoptosis facilitator)</i>
BNIP3 –	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3</i>
<i>bok</i> –	<i>bcl-2-related ovarian killer</i>
c-DNA –	<i>complementary DNA synthesized for reverse transcriptase</i>
c-MPL –	receptor de trombopoetina
<i>c-iap-1</i> –	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 2, apoptosis inhibitor 1</i>
<i>c-iap-2</i> –	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 3, apoptosis inhibitor 2</i>
Ct –	<i>Threshold cycle</i>
CXCR4 –	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DD –	Death domain
DED –	<i>Death effector domain</i>
DIABLO –	<i>Direct inhibitor of apoptosis protein (IAP) - binding protein with low PI</i>
DISC –	<i>Death-inducing signalling complex</i>
DNA –	Ácido desoxirribonucléico
DR4 –	<i>Death receptor 4 (TRAIL receptor 1)</i>
DR5 –	<i>Death receptor 5 (TRAIL receptor 2)</i>
ECL –	<i>Enhanced chemiluminescent</i>
EDTA –	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO –	eritropoetina

ERK –	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FADD –	Proteínas adaptadoras FAS associada com DD
FAIM –	<i>Fas apoptosis inhibitory molecule</i>
FAPESP –	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fas/CD95 –	Receptor de morte
<i>Fas-L</i> –	<i>fas ligand</i>
FCFRP–	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FERM –	<i>Four point-one Ezrin Radixin Moesin domain</i>
FGF –	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC –	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<i>flip</i> –	<i>Like caspase-8 (FLICE)-inhibitory proteins</i>
G1 –	Fase gap da mitose
GATA-1 –	<i>GATA binding protein 1(globin transcription factor 1)</i>
HCFMRP-USP –	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP
HRP –	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IDV –	<i>Integrated density value</i>
IAPs –	<i>Inhibitory apoptosis proteins</i>
IL-5/6 –	<i>Interleucina 5/6</i>
JAK –	<i>Tyrosine kinases of the Janus kinase family</i>
JAK2 –	<i>Janus Kinase 2</i>
JAK2 V617F –	<i>Janus Kinase 2</i> mutada no aminoácido 617, troca de Valina por Fenilalanina
JH2 –	<i>JAK homology 2</i>
JH1 –	<i>JAK homology 1</i>
LEC-NEOS –	Leucemia eosinofílica crônica, não especificada
LMA –	Leucemias mielóides agudas
LMC –	Leucemia mielóide crônica
LMJ –	Leucemia mielomonocítica juvenil
LMMC –	Leucemia mielomonocítica crônica
LNC –	Leucemia neutrofílica crônica
MAPK –	<i>Mitogen-activating protein kinase</i>
<i>mcl-1</i> –	<i>Myeloid cell leukemia</i>
MF –	Mielofibrose
MO –	medula óssea
MOC –	Medula óssea do controle
MOP –	Medula óssea de paciente
NF- κ B –	<i>Nuclear factor-kappa B protein</i>

NMPC –	Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas
<i>nox</i> –	<i>Pro-apoptotic BH3-only member of bcl-2</i>
OMS –	Organização Mundial da Saúde
pb –	pares de base
PBS –	<i>Phosphate buffer solution</i>
PCR –	Reação em cadeia da polimerase
PDGF –	platelet derived growth factor
PI3K –	<i>Phosphoinositol - 3 kinase</i>
PRV-1 –	Receptor de Policitemia rubra vera
<i>puma</i> –	<i>p53-up-regulated modulator of apoptosis</i>
PV –	Policitemia vera
PVDF –	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RAS –	<i>Ras association domain family</i>
RAR –	<i>retinoic acid receptor</i>
RB –	gene <i>Retinoblastoma</i>
RNA –	Ácido ribonucleico
RNA _m –	RNA mensageiro
S –	Fase de síntese de DNA na mitose
SDF1–	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SDS-PAGE –	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SMAC –	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SPC –	Sangue periférico do controle
STAT –	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TA –	Temperatura de anelamento do <i>primer</i> .
TE –	Trombocitemia Essencial
TGF-β –	<i>Transforming growth factor</i>
TNF –	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNF-R –	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TPO –	Trombopoetina
TRAIL –	<i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i>
USP –	Universidade de São Paulo
X-IAP –	<i>Linked inhibitor of apoptosis protein</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Neoplasias Mielóides Crônicas.....	21
1.1.1. Considerações Gerais	21
1.1.2. Mielofibrose Primária.....	23
1.1.3. Trombocitemia Essencial	27
1.1.4. Etiologia da Mielofibrose Primária e da Trombocitemia Essencial	29
1.1.5. A mutação JAK2V617F e as NMPC.....	34
1.2. Apoptose.....	37
1.3. MicroRNA, Apoptose e Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas	43
2. OBJETIVOS	46
2.1. Objetivo Geral.....	47
2.2. Objetivos Específicos.....	47
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	48
3.1. Casuística.....	49
3.2. Métodos	53
3.2.1. Obtenção de células mononucleares, leucócitos e células precursoras hematopoéticas	53
3.2.2. Determinação do Hemograma dos Pacientes	54
3.2.3. Detecção da mutação JAK2 V617F no sangue periférico.....	54
3.2.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real	55
3.2.5. Indução de apoptose celular e detecção por citometria de fluxo	61
3.2.6. Obtenção de proteína de leucócitos dos pacientes com TE e MF e controles.....	62
3.2.7. Detecção das proteínas pró-e anti-apoptóticas por <i>Western Blot</i>	62
3.2.8. Detecção da percentagem de células mononucleares marcadas para FAS e FAS-L por citometria de fluxo	63
3.2.9. Detecção da Expressão de microRNAs por PCR em tempo real.....	63
3.2.10. Análises Estatísticas	65
4. RESULTADOS	66
4.1. Obtenção das células CD34 ⁺ de indivíduos saudáveis e pacientes e determinação da pureza por citometria de fluxo.....	67
4.2. Detecção da mutação JAK2V617F no sangue periférico e parâmetros hematológicos dos pacientes.....	70

4.3. Detecção da expressão gênica por real time PCR em células CD34 ⁺	72
4.3.1. Quantificação da expressão dos genes endógenos em células CD34 ⁺	72
4.3.2. Quantificação da expressão dos genes da família Bcl-2 em células CD34 ⁺	75
4.3.3. Quantificação da expressão dos genes da família dos inibidores de apoptose <i>c-iap-1</i> , <i>c-iap-2</i> , <i>XIAP</i> e <i>survivina</i> em células CD34 ⁺	78
4.3.4. Quantificação da expressão dos genes relacionados à regulação da via extrínseca da apoptose.....	79
4.4. Detecção da expressão gênica por real time PCR em leucócitos	81
4.4.1. Quantificação da expressão dos genes endógenos em leucócitos do sangue periférico	81
4.4.2. Quantificação da expressão dos genes da família Bcl-2	86
4.4.3. Quantificação da expressão dos genes família dos inibidores de apoptose – <i>c-iap-1</i> , <i>c-iap-2</i> , <i>XIAP</i> e <i>survivina</i>	88
4.4.4. Quantificação da expressão dos genes relacionados à via extrínseca da apoptose.....	90
4.5. Determinação da expressão do gene <i>PRV-1</i> em células CD34 ⁺ e leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial e Mielofibrose.....	91
4.6. Correlação da expressão do gene <i>PRV-1</i> e genes relacionados à apoptose em leucócitos de pacientes com TE e MF	92
4.7. Correlação da expressão genes anti e pro-apoptóticos com a mutação JAK2V617F.....	94
4.8. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F e os parâmetros hematológicos dos pacientes	97
4.9. Correlação da expressão gênica com parâmetros hematológicos dos pacientes e esplenomegalia	98
4.9.1. Correlação da expressão gênica com parâmetros hematológicos	98
4.9.2. Correlação da expressão gênica com esplenomegalia.....	102
4.10. Correlações da expressão do gene <i>PRV-1</i> com a mutação JAK2V617F, parâmetros hematológicos e esplenomegalia	105
4.10.1. Comparação da expressão do gene <i>PRV-1</i> em pacientes positivos e negativos para a mutação JAK2V617F e correlação com a porcentagem de alelos mutados.....	105
4.10.2. Correlação da expressão do gene <i>PRV-1</i> com parâmetros hematológicos dos pacientes e esplenomegalia	106
4.11. Ensaio de indução de apoptose de linfócitos	108
4.12. Correlação entre expressão gênica e a porcentagem de linfócitos em apoptose induzida por drogas.....	110
4.12.1. Correlação entre expressão gênica e apoptose detectada pela marcação com Anexina-V FITC.....	110
4.12.2. Correlação entre a expressão do gene <i>PRV-1</i> e a porcentagem de apoptose.....	113
4.13. Análise da expressão proteica em leucócitos do sangue periférico por <i>Western Blot</i> ..	114
4.14. Detecção da expressão protéica (FAS E FAS-L) em células mononucleares do sangue periférico por Citometria de Fluxo.....	119

4.15. Análise da expressão de miRNA	120
5. DISCUSSÃO	125
6. CONCLUSÕES.....	135
REFERÊNCIAS.....	137
APÊNDICES	158
Apêndice 1 .Quadro Resumo dos Resultados mais relevantes.....	159
Apêndice 2. Manuscrito publicado no “Journal of Clinical Pathology”	161
ANEXO	170
Anexo 1. Aceite do Comitê de Ética.....	171

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neoplasias Mielóides Crônicas

1.1.1. Considerações Gerais

As Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas (NMPC), anteriormente denominadas Doenças mieloproliferativas crônicas (DMPC), são resultantes da expansão clonal da célula tronco hematopoética alterada e caracterizam-se pela independência ou hipersensibilidade dos progenitores hematopoéticos a numerosas citocinas (SPIVAK, 2002; PRCHAL, 2005; TEFFERI, 2010). As NMPC têm em comum a hiper celularidade da medula óssea decorrente da proliferação exacerbada dos componentes da linhagem mielóide com maturação preservada e que conduz à leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocítica ou trombocitose. Além disso, tem em comum a hematopoese extramedular, presença de megacariócitos medulares hiperplásicos e diferentes graus de displasia (KAUSHANSKY, 2005). Essas últimas características parecem ser as responsáveis pela Mielofibrose e pela tendência dos pacientes desenvolverem complicações trombóticas e hemorrágicas (KAUSHANSKY, 2005). Essas doenças compartilham características relacionadas à patogênese, como mutações adquiridas nos genes JAK2, TET2, CBL e MPL (JAMES et al., 2005; BAXTER et al., 2005; LEVINE et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; ZHAO et al., 2005; PIKMAN et al., 2006; SCOTT et al., 2007, DELHOMMEAU, 2009; GRAND et al., 2009). A progressão das NMPC caracteriza-se pelo aparecimento de fibrose medular, ou transformação em Síndrome Mielodisplásica ou leucêmica (10% dos casos para Leucemia Mielóide Aguda) (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002; FINAZZI; BARBUI, 2005; THEPOT et al., 2010). Como descrito no início desse tópico, segundo o documento da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2008 (SWERDLOW et al., 2008) o termo Doenças Mieloproliferativas Crônicas foi substituído por Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas e esse novo grupo enquadra-se nas Neoplasias Mielóides Crônicas, conforme especificado na tabela 1.

Tabela 1. Classificação das Neoplasias Mielóides de acordo com a OMS.

-
1. Neoplasias Mieloproliferativas
 - 1.1. Leucemia Mielóide Crônica (LMC), BCR-ABL positivas
 - 1.2. Policitemia vera (PV)
 - 1.3. Trombocitemia Essencial (TE)
 - 1.4. Mielofibrose Primária (MF)
 - 1.5. Leucemia Neutrofílica Crônica (LNC)
 - 1.6. Leucemia Eosinofílica Crônica, não especificada (LEC-NEOS)
 - 1.7. Doença de Mastócito (DM)
 - 1.8. Neoplasia mielóide não classificada
 2. Neoplasias mielóides e linfóides com eosinofilia e anormalidade de PDGFRA, PDGFRB, e FGFR1
 3. Síndrome Mielodisplásicas (SMD) /Neoplasias Mielóides
 - 3.1. Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC)
 - 3.2. Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMJ)
 - 3.3. Leucemia Mielóide Crônica Atípica (aLMC), *BCR-ABL*-negativa
 - 3.4. SMDS/NMPC, não classificadas
 4. Síndromes Mielodisplásicas (SMD)
 5. Leucemia Mielóide Aguda (LMA)
-

BCR-ABL: gene de fusão do resultante do rearranjo da t(9;22) . PDGFRA: receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaqueta. PDGFRB: receptor beta do fator de crescimento derivado de plaqueta. FGFR1: FIP1L1-PDGFRB: gene de fusão de Fip1-like 1 com receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaqueta.

A primeira tentativa de se estabelecer critérios para o diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL negativas (PV, TE e MF), ocorreu em 1976 (DAMESHEK, 1951; TEFFERI, 2008; TEFFERI; THIELE; VARDIMAN, 2009b) e tinha como base a exclusão de outras causas de eritrocitose ou trombocitose, subutilizando a histologia de medula óssea, a qual só passou a fazer parte de modo fundamental dos critérios diagnósticos elaborados pela OMS em 2001. Recentemente, a descrição de mutações no gene da proteína quinase JAK2 e outras alterações moleculares juntamente com parâmetros hematológicos e a observação da histologia de medula óssea possibilitaram o refinamento dos critérios diagnósticos (TEFFERI; VARDIMAN, 2008; SWERDLOW et al., 2008).

A presente investigação estudará a fisiopatologia da Mielofibrose Primária e da Trombocitemia Essencial.

1.1.2. Mielofibrose Primária

A Mielofibrose Primária (MF) é uma NMPC caracterizada por panmielose sem alterações na maturação celular, fibrose progressiva na medula óssea, anemia, esplenomegalia e hematopoese extramedular presente em múltiplos órgãos, sintomas constitucionais como fadiga, e suores noturno e, perda de peso (AHMED; CHANG, 2006).

Recentemente, o Grupo Internacional de Pesquisa e Tratamento em Mielofibrose concluiu que as denominações mais adequadas seriam: Mielofibrose Primária, Mielofibrose pós - Policitemia Vera, Mielofibrose pós - Trombocitemia Essencial e Fase Blástica da Mielofibrose Primária referente àqueles casos nos quais a MF progredi para leucemia aguda (MESA et al., 2007).

A incidência anual da MF é de 0,3 a 1,5 por 100.000 indivíduos, sendo mais frequente após os sessenta anos de idade (ALTURA; HEAD; WANG, 2000; BONDUEL et al., 1998) e prevalência similar em homens e mulheres (TEFFERI, 2005). Nenhum aumento na incidência da MF foi detectado por Girodon e colaboradores (2009) recentemente num estudo retrospectivo que incluiu 524 pacientes com Neoplasias Mielóides, sendo 81 pacientes com MF, de um período de 1980 a 2007. (GIRODON et al., 2009).

A etiologia da MF é desconhecida, sabe-se que essa doença pode advir da progressão de doenças hematológicas, como PV, TE, LMC e Linfoma de Hodgkin, como também de outras de origem não hematológica, como intoxicações, infecções, carcinoma de mama e de próstata (MESA et al., 2000; REEDER et al., 2003; REILLY et al., 1997). No caso de pacientes com PV, 25% a 50% evoluem para Mielofibrose, enquanto que em casos de TE, apenas 2% a 3% desses. (NAJEAN; DRESCH; RAIN, 1994).

Quanto às manifestações clínicas, aproximadamente 30% dos pacientes com MF são assintomáticos e o diagnóstico é sugerido por achados anormais no sangue e/ou por esplenomegalia descobertos ao acaso (CERVANTES; BAROSI, 2005). Nos demais casos da doença, os pacientes apresentam sinais e sintomas secundários ao estado hipercatabólico como febre, perda de peso e suores noturnos, decorrentes da anemia como fadiga e dispnéia e da trombocitopenia e/ou função plaquetária anormal entre eles sangramentos e petéquias. A

esplenomegalia está presente em 90% dos casos, sendo o principal achado físico nesses pacientes e, a hepatomegalia ocorre em aproximadamente 60% deles (AHMED; CHANG, 2006). A Metaplasia Mielóide, que corresponde a hematopoese extramedular (baço e fígado, principalmente) é frequente, sendo possível a ocorrência de fibrose nesses órgãos (WOLF; NEIMAN, 1985; THIELE et al., 1993).

Segundo o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2008, três dos critérios maiores e dois menores devem estar presentes para o diagnóstico da Mielofibrose Primária e estão descritos na tabela 2 (TEFFERI, VARDIMAN, 2008).

Tabela 2. Critérios utilizados para o diagnóstico da Mielofibrose Primária, de acordo com as definições da Organização Mundial da Saúde em 2008.

A. Critérios maiores
<ol style="list-style-type: none"> 1. Proliferação megacariócitos e atipias acompanhada por fibrose ou, na ausência de fibrose reticulínica, alterações dos megacariócitos devem ser acompanhadas por hipercelularidade da medula, proliferação de granulócitos e frequente diminuição da eritropoese (ex. MF pré-fibrótica). 2. Não se enquadrar nos critérios de LMC, PV, SMD, ou outra neoplasia mielóide. 3. Presença da mutação JAK2V617F ou outro marcador de clonalidade ou nenhuma evidência de fibrose de medula reativa
B. Critérios Menores
<ol style="list-style-type: none"> 1. Leucoeritroblastose 2. Aumento de Lactato-Desidrogenase. 3. Anemia 4. Esplenomegalia palpável

Recentemente, Barbui et al. (2011) publicaram uma revisão com recomendações da “European LeukemiaNet”, que trata do consenso sobre o diagnóstico das NMPC Philadelphia-negativo, reforçando os critérios estabelecidos pela OMS em 2008, mas comentando sobre a necessidade de incorporar outros critérios de menor relevância para confirmação como achados histopatológico sugestivo de Mielofibrose em fase pré-fibrótica (BARBUI et al., 2011).

Testes laboratoriais adicionais como a quantificação de células CD34⁺ circulantes (PASSAMONTI et al., 2003) e de células progenitoras endoteliais no sangue periférico (MASSA et al., 2005; RAFFI; LYDEN, 2003), detecção de alterações citogenéticas (HUSSEIN et al, 2007) e pesquisa de alterações moleculares, como a mutação JAK2V617F (STEENSMA et al., 2005; TEFFERI, VAINCHENKER, 2011), são relevantes para o diagnóstico e, em alguns casos, são utilizados para o monitoramento e prognóstico dos pacientes.

Até 2008, os Critérios Clínicos e Patológicos Europeus consideravam quatro estágios de evolução da MF são: pré-fibrótico, recente, manifesta e final (AHMED; CHANG, 2006) e os critérios da Sociedade Italiana de Hematologia igualmente utilizavam esses critérios para o diagnóstico diferencial e os estágios da MF estabelecidos por esse grupo não incluíam o estágio pré-fibrótico (AHMED; CHANG, 2006; BAROSI et al., 1999). Atualmente, o diagnóstico da Mielofibrose é feito de acordo com os critérios da OMS acima descritos e o diagnóstico de Mielofibrose pós-PV e pós-TE é feita de acordo com o IWG-MRT (International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment) (BAROSI et al., 2008; TEFFERI, 2011).

O prognóstico dos pacientes com MF é atualmente baseado no modelo denominado Sistema Internacional de Pontuação de Prognóstico (International Prognostic Scoring System – IPSS) ou no modelo Sistema Internacional de Pontuação de Prognóstico Dinâmico (Dynamic International Prognostic Scoring System-plus - DIPSS-plus). Ambos IPSS e DIPSS utilizam os mesmo cinco fatores de risco para sobrevivência: idade maior de 65 anos, Hemoglobina < 10ug/dL, leucócitos < 25 x 10⁹/L, blastos circulantes < 1%, e sintomas constitucionais. Mais recentemente, o IPSS para MF incluiu como fatores a serem considerados a necessidade de transfusão, cariótipo desfavorável e trombocitopenia (GANGAT et al., 2011). Estes sistemas classificam os pacientes em baixo, intermediário-1, intermediário -2 e alto risco com a média de sobrevida estimada em 15,4; 6,5; 2,9 e 1,3 anos, respectivamente. A diferença entre eles é que o IPSS é usado para estimar a sobrevida a partir do diagnóstico e o DIPSS é utilizado a partir de qualquer fase da doença. Os dados obtidos por esses sistemas de pontuação são usados para a escolha da estratégia terapêutica mais adequada para todos os pacientes (TEFFERI, 2011).

De modo geral, o prognóstico dos pacientes com MF é o pior dentre as NMPC e a sobrevida dos pacientes é em média de 3,5 a 5,5 anos a partir do diagnóstico (ARANA-YI et al., 2006). A morbidade e a mortalidade associadas à MF estão relacionadas à ocorrência de

infecções, hemorragias, hipertensão portal, falência cardíaca, trombose, complicações pós-esplenectomia e evolução para leucemia aguda (LMA) (ARANA-YI et al., 2006).

Com relação à terapia para MF, as escolhas são difíceis devido à sua heterogeneidade no que diz respeito à idade dos pacientes, características fenotípicas e prognóstico. O tratamento da MF é apenas paliativo e não altera o curso da doença (KROGER; MESA, 2008). A única opção potencialmente curativa é o transplante alogênico de células tronco hematopoéticas, limitado a pacientes jovens sem co-morbidades graves. Ainda hoje, as terapias medicamentosas mais comuns visam somente melhorar a qualidade de vida de paciente, controlar os sintomas, as citopenias e a esplenomegalia (MESA, 2010).

Destacam-se como estratégias terapêuticas de investigação empregadas nas NMPC (KUMAR et al., 2009, BAROSI; ROSTI, 2009):

1. Citorredutivos (hidroxiuréia);
2. Imunomoduladores (ex. interferon alfa oral e talidomida);
3. Agentes bloqueadores de citocinas (ex. antagonista de IL-5/IL-6);
4. Inibidores de quinase.
5. Inibidores de fibrogênese como inibidores de TGF- β , TNF- α e PDGF, foram testados, mas não demonstraram atividade clínica significativa quando comparados às terapias clássicas (KROGER; MESA, 2008; MESA et al., 2001).

A hidroxiuréia (hidroxicarbamida) é um fármaco bem tolerado que controla a leucocitose e a trombose que ocorrem na MF, sendo indicada quando há a presença de fatores de risco. Porém, ela não apresenta bons resultados com relação à esplenomegalia e pode agravar o quadro de anemia ou trombocitopenia. O imunomodulador interferon alfa, utilizado por seus efeitos citorredutivos, diminui a proliferação de megacariócitos e fibroblastos e consequentemente a leucocitose e/ou a trombocitose. O IFN em alguns casos pode levar a regressão da fibrose medular, mas os ensaios clínicos não têm mostrado os resultados esperados (KROGER; MESA, 2008; TEFFERI et al., 2001). Os ensaios com talidomida mostram resultados razoáveis, minimizando a necessidade de transfusão (WEINKOVE et al., 2008) e o imunomodulador lenalidomide permitiu que os pacientes alcançassem resposta clínica e hematológica (BAROSI; ROSTI, 2009; TEFFERI et al., 2007).

Os inibidores em fases de estudo clínico mais avançadas incluem INCB018424 (VERSTOVSEK et al., 2010), TG101348 (PARDANANI et al., 2009), SB1518 (VERSTOVSEK et al., 2009) e CEP-701 (ou Lestaurtinibe) (HEXNER et al., 2008). Todos

esses reduzem rapidamente a esplenomegalia e os sintomas constitucionais, sem alterar as características moleculares ou histológicas (Van ETEN et al., 2011).

O INCB018424 (Incyte, Wilmington, DE) é o inibidor que está na fase mais avançada de testes clínicos (fase III) nos Estados Unidos e Europa (MESA, 2010). Verstovsek e colaboradores publicaram em 2009 um estudo de fase II com o INCB018424 em que participaram 155 pacientes e demonstraram que 50% atingiram resposta clínica com melhora da esplenomegalia de acordo com IWG-MRT (International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment) (MESA, 2010).

De acordo com um estudo sobre a segurança e eficácia do inibidor TG101348, este parece ser o único que reduz significativamente a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F (PARDANANI et al., 2011). O inibidor TG-101348 gerou redução de modo dose dependente do tamanho do baço, do hematócrito e da hematopoese extramedular em um modelo animal (WERNIG et al., 2008), mas pode não reduzir as complicações em pacientes com NMPC (KUMAR et al., 2009). Também foi observado que pacientes JAK2V617F negativos respondem ao TG101348, o que sugere a existência de outra alteração na via JAK/STAT nesses pacientes (PARDANANI et al., 2011).

Assim, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, que resultem no aumento da sobrevida do paciente com MF, melhore sua qualidade de vida ou até mesmo cure o paciente, depende do melhor entendimento da fisiopatologia da MF (ARANA-YI et al., 2006, REILLY, 2006).

1.1.3. Trombocitemia Essencial

A Trombocitemia Essencial (TE) é uma doença caracterizada por proliferação excessiva de um clone megacariocítico maligno na medula óssea com persistente aumento de plaquetas morfológica e funcionalmente anormais circulantes. Essa proliferação ocorre na ausência de estímulo fisiológico reconhecível, sem fibrose da medula e massa eritrocítica normal (TEFFERI; MURPHY, 2001). Os precursores megacariocíticos na TE são capazes de dar origem a colônias celulares *in vitro* na ausência de trombopoetina exógena (GREEN et al., 2004; HARRISSON; GREEN, 2003). Na TE, os níveis séricos de trombopoetina (TPO) estão normais e não foram descritas mutações no gene da TPO ou de seu receptor (*c-mpl*) (TEFFERI; MURPHY, 2001).

Os quatro critérios empregados pela OMS para o diagnóstico da TE, de acordo com Tefferi e Vardiman (2008), estão relatados na tabela 3.

Tabela 3. Critérios utilizados para o diagnóstico da Trombocitemia Essencial, de acordo com as definições da Organização Mundial da Saúde em 2008.

1. Contagem de plaquetas maior que $450 \times 10^9/L$
2. Proliferação de megacariócitos maduros e grandes. Nenhuma ou pouca proliferação de células granulocíticas e eritrocíticas.
3. Não se encaixar nos critérios de LMC, PV, PMF, SMD ou outra neoplasia mielóide.
4. Presença JAK2V617F ou outro marcador clonal ou sem evidência de trombose reativa.

Sua incidência na população é de 2,5 casos por 100.000 indivíduos por ano e é mais prevalente em mulheres do que em homens. Girodon et al. (2009) relataram, assim como outros autores, um pequeno aumento na incidência da TE relacionado, principalmente, disponibilidade da contagem de plaquetas em exames de rotina (GIRODON et al., 2005; JOHANSSON, 2006; GIRODON et al., 2009). Além disso, um pronunciado aumento da incidência de TE tem sido notado a partir de 2005, principalmente devido à detecção da mutação JAK2V617F e às mudanças nos critérios diagnósticos com relação ao número de plaquetas. A mediana da idade ao diagnóstico é de 60 anos, cerca de 20% dos pacientes tem idade inferior a 40 anos (GREEN et al., 2004; HARRISSON; GREEN, 2003).

Os fatores de morbidade da TE incluem trombose arterial ou venosa e eventos hemorrágicos (PALANDRI et al., 2009). A sobrevida varia de 5 a 10 anos (GREEN et al., 2004) e os fatores de risco associados a menor sobrevida são: ocorrência de trombose, leucocitose, idade avançada e anemia (GANGAT et al., 2007; PASSAMONTI et al., 2004; TEFFERI; VAINCHENKER, 2011). O sistema de prognóstico utilizado para pacientes com TE utiliza a idade superior a 60 anos e leucocitose para estabelecer três faixas de risco (alto, médio e baixo) sendo a média de sobrevivência de 25, 17 e 10 anos, respectivamente (VANNUCCHI; GUGLIELMELLI; TEFFERI, 2009; WOLANSKYJ et al., 2006).

Pacientes com TE podem progredir para Mielofibrose (8% em 10 anos) ou menos frequentemente, para leucemia mielóide aguda (1,4% em 10 anos e 8,1% em 20 anos) (KUMAR et al., 2009). A leucocitose tem sido associada com a transformação leucêmica ou

transformação fibrótica em PV. As relações entre trombose e leucocitose, trombose e JAK2V617F ou complicações na gravidez e JAK2V617F61 têm sido estudadas, mas os resultados ainda são inconclusivos (TEFFERI, VAINCHENKER, 2011).

O objetivo do tratamento da TE é reduzir o risco de eventos trombóticos, sendo realizado por meio da terapia antiplaquetária (normalmente aspirina) e com medicamentos citorredutivos em pacientes de alto risco (com plaquetas $> 1,5$ milhões/mm³) (BEER et al., 2011; HELMANN, 2008). A hidroxiuréia (ou hidroxycarbamida) é a mais utilizada, devido a sua eficácia, baixo custo e rara toxicidade, normalmente em conjunto com ácido acetilsalicílico (GREEN et al., 2004; HERNÁNDEZ-BOLUDA et al., 2011). Na revisão de Tefferi e Vainchenker (2011), é relatado que em caso de intolerância ou resistência à hidroxiuréia, o Interferon ou Bussulfan podem ser efetivos, mas devem ser escolhidos baseados nas características do paciente (TEFFERI, VAINCHENKER, 2011).

De acordo com Beer et al. (2011), ainda não existem estudos prospectivos que confirmem a utilidade de considerar como novos fatores de risco de trombose a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F, a contagem de leucócitos e o grau de fibrose medular, não sendo então usados para guiar a decisão terapêutica (BEER et al., 2011).

Outras opções para a terapia são o uso de imunomoduladores como antagonista de IL5/IL6, e o anagrelide. No caso deste último, droga que inibe a diferenciação de megacariócitos e, por conseguinte reduz a contagem plaquetária (SOLBERG et al., 1997), vários estudos demonstram sua eficácia. Os resultados de estudos que comparam os riscos-benefícios do anagrelide e da hidroxiuréia são conflitantes, sendo que na prática o anagrelide acaba sendo utilizado no caso de refratariedade ou intolerância à mesma (BEER et al., 2011; CACCIOLA et al., 2005; TEFFERI, VAINCHENKER, 2011).

Como descrito na seção referente à terapia em MF, o estudo com inibidores da JAK quinase ou inibidores multiquinase em TE, dois deles (INCB018424 e CEP701) estão em ensaio clínico em fase avançada e têm apresentado resultados promissores no controle da evolução da doença (KUMAR et al., 2009; SANTOS; VERSTOVSEK, 2011).

1.1.4. Etiologia da Mielofibrose Primária e da Trombocitemia Essencial

Apesar do conhecimento acumulado, em especial na última década, sobre as NMPC, pouco se conhece sobre a patogênese da MF e da TE. Com efeito, raros marcadores de

prognóstico e diagnóstico foram descritos e, apesar do progresso considerável nos estudos dos mecanismos celulares e moleculares que participam da patogênese das NMPC (DELHOMMEAU et al., 2010; REILLY, 2006; TEFFERI; VAINCHENKER, 2011), sua fisiopatologia não foi totalmente desvendada. Dentre os processos celulares implicados na fisiopatologia da MF, os mais conhecidos são a clonalidade, a fibrose medular, a hematopoese extramedular e o aumento do número de células CD34⁺ no sangue periférico.

A clonalidade é definida como a expansão de células tronco hematopoéticas multipotentes (AHMED; CHANG, 2006; JONES et al., 2004; KAUSHANSKY, 2005) geneticamente transformadas, que retém a capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens e passam a sustentar a hematopoese (TEFFERI, 2005). As primeiras evidências da clonalidade na MF surgiram por volta de 1968 (ENGEL et al., 1968) e posteriormente essa característica foi demonstrada em progenitores eritróide e granulocítico-monocítico por estudos de citogenética (RUUTU; PARTANEN; KNUUTILA, 1983). Reeder et al. (2003) demonstraram que, além da presença de marcadores citogenéticos clonais em células da linhagem mielóide, linfócitos B e T de sangue periférico apresentavam essas alterações em 75% dos pacientes com MF.

A intensa fibrose medular, observada frequentemente nos pacientes com MF é a responsável pela perda de elementos celulares hematopoéticos. Acredita-se que a excessiva proliferação dos fibroblastos policlonais (CASTRO-MALASPINA; GAY; JHANWAR, 1982), que origina a fibrose medular, seja resultante da liberação maciça de fatores de crescimento e citocinas sem estímulo prévio ou regulação. Dentre esses fatores de crescimento estão o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (Platelet-Derived Growth Factor-PDGF), liberado por plaquetas, e o Fator Transformador de Crescimento- β (Transforming Growth Factor; TGF- β), liberado por megacariócitos e monócitos (REILLY, 2006). Wang et al. (2006) detectaram uma maior expressão gênica desses fatores em megacariócitos obtidos de cultura de células precursoras de paciente com MF.

Segundo Bock et al., algumas das proteínas morfogênicas do osso, do inglês *bone morphogenetic proteins* (BMP), entre elas BMP1 e BMP6, estão *superexpressas* em pacientes com Mielofibrose e provavelmente estão envolvidas na patogênese desta doença, por meio da ativação direta de TGF- β latente e indiretamente, induzindo sua própria expressão seguida por exacerbado processamento de precursores de colágeno e contribuindo para a síntese de matrix extracelular (BOCK et al., 2008).

Outro fato que parece contribuir para o aumento dos níveis dos fatores de crescimento, conforme Schmitt et al. (2002), é a alteração no processo de “emperipolesis”, que corresponde

ao englobamento de neutrófilos e eosinófilos por megacariócitos. A intensificação deste processo resulta na morte do megacariócito com consequente liberação de TGF- β e bFGF, que estão presentes em seu interior. A maior liberação de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), por megacariócitos e plaquetas circulantes desses pacientes, colaboraria para o aumento da proliferação de fibroblastos e desenvolvimento de fibrose (AHMED; CHANG, 2006; WANG et al., 2006).

Assim, a alteração dos fibroblastos leva a modificação da expressão de moléculas de adesão e aumento do depósito de matriz extracelular devido à liberação excessiva de fatores de crescimento em excesso pelos clones e principalmente megacariócitos necróticos. Células do estroma são condicionadas pelas células hematopoéticas malignas e reciprocamente, por adquirir novas propriedades, células do estroma criam microambiente patológico que participa na manutenção do clone, comprometendo a hematopoese normal (LATAILLADE et al., 2008).

A hematopoese extramedular tem origem incerta. Uma hipótese que explica sua ocorrência é a de que células tronco quiescentes desde a vida fetal, no fígado e no baço, recuperariam a atividade hematopoética e se redistribuiriam segundo o padrão fetal (PORCU; NEIMAN; ORAZI, 1999; WILKINS et al., 1994; WOLF ; NEIMAN, 1985). Outra teoria, descrita por O'Malley et al. (2005), é a de que células tronco provenientes da medula óssea residiriam em outro órgão, como o baço, e seriam responsáveis pela hematopoese extramedular.

O aumento do número de células CD34⁺ circulantes no sangue periférico ocorre em todas as NMPC, mas é mais intenso na MF. Pacientes com MF apresentam cerca de 360 vezes mais células CD34⁺ no sangue periférico quando comparados a pessoas saudáveis, e cerca de dezoito a trinta vezes quando comparado a pacientes com PV e TE (BAROSI et al., 2001). Xu et al. (2005) correlacionaram o aumento de células CD34⁺ circulantes com a diminuição das interações adesivas que normalmente ocorrem entre essas células e o estroma medular. Esses autores concluíram que a alteração na adesão das células CD34⁺ decorreria do aumento do nível de proteases plasmáticas (elastase neutrofílica e metaloproteinase de matriz – 9) e da degradação da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1) nos pacientes com MF.

O aumento da angiogênese também participa na patogênese da MF, devido ao papel indireto do TGF- β e PGDF como angiogênicos induzindo citocinas como, por exemplo, o VEGF- α . Steurer et al. (2007) encontraram correlação entre VEGF, densidade microvascular

e parâmetros prognósticos estabelecidos do estágio fibrótico, aberrações cromossômicas e sobrevivência (STEURER et al., 2007).

Os estudos de alterações citogenéticas e genéticas têm revelado que as deleções mais frequentes ocorrem no braço longo dos cromossomos 13 e 20 e são classificadas como anormalidades favoráveis. A trissomia do cromossomo 8, anormalidades dos cromossomos 1, 7 e 9 (mais de 80%) não específicas também foram descritas para a MF. A anormalidade cromossomal Der(6) t(1;6) (q23-25;p21-22) é um possível marcador para essa desordem segundo o estudo de Reilly (2008) envolvendo a proteína FKBP51. Por outro lado, a presença da proteína quimérica TEL-PDGFR β t(5;12) (q22;q13) seria um fator de prognóstico favorável visto que os pacientes que a apresentam são responsivos ao inibidor de tirosina quinase, mesilato de imatinibe (REILLY, 2008).

Além desses dados, parece ser bastante relevante a presença de outras anomalias genéticas e moleculares, como: (1) mutação somática no gene que codifica a JAK-2 (família Janus quinase - JAK), presente em 50% dos pacientes com MF e TE (JAK2V617F) (BAXTER et al., 2005; JONES et al., 2005; STEENSMA et al., 2005); (2) mutação em genes que codificam transdutores de sinais e ativadores de transcrição STAT (ARANA-YI et al., 2006); (3) alterações na expressão gênica do fator de transcrição GATA-1 (Fator de Transcrição de Globulina) e do RAR- β 2 (receptor nuclear de ácido retinóico β 2) (GURBUXANI; VYAS; CRISPINO, 2004; JONES et al., 2004). O fator de transcrição GATA-1 é essencial para o desenvolvimento de eritrócitos, megacariócitos, eosinófilos e mastócitos e o RAR tem papel de destaque na diferenciação de células precursoras hematopoéticas (AHMED; CHANG, 2006).

Recentemente, Theophile e co-autores (2008) verificaram a desregulação da expressão de alguns genes envolvidos no controle da apoptose em megacariócitos de medula óssea de pacientes com MF, destacando-se o BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 Kda interaction protein) e a proteína quinase C β 1. (THEOPHILE et al., 2008)

Na Trombocitemia Essencial, os mecanismos que conduzem à trombocitose são pouco conhecidos e as alterações citogenéticas são raras, ocorrendo apenas em 5 a 10% dos casos a del 13q e 20q trissomia do cromossomo 8 ou 9 (BENCH; ERBER; SCOTT, 2005; REILLY, 2008). A prevalência das anormalidades citogenéticas em TE ao diagnóstico foi de 7% e as mais comuns foram a trissomia do 9, anormalidades do cromossomo 1 e a trissomia do 8 (GANGAT et al., 2009).

A trombocitose parece originar-se não somente do aumento da produção de plaquetas como também do aumento da vida média de plaquetas e megacariócitos (van ETTEN; SHANNON, 2004). O pool de progenitores megacariocíticos do sangue periférico e da medula óssea dos pacientes com TE proliferam *in vitro* sem estímulo e mostram-se extremamente sensíveis à ação de citocinas como IL-3 e TPO, mas não GM-CSF e TGF- β 1 (KAWASAKI et al., 2001).

Na TE os níveis séricos de TPO são normais ou ligeiramente aumentados e não foram descritas mutações no gene da TPO ou de seu receptor (*c-mpl*) (TEFFERI; MURPHY, 2001). Além disso, a expressão dos receptores c-MPL está reduzida numa porcentagem dos pacientes com TE e sua ativação não é constitutiva. Esses dados apontam, portanto, para ausência de associação entre trombocitose e os níveis de trombopoetina e de seu receptor.

Outras moléculas têm sido também investigadas quanto a participação na patogênese das NMPC, dentre essas se destacam àquelas envolvidas no controle da apoptose celular e vias de sinalização celular importantes para funções vitais das células hematopoéticas.

Zhang et al. (2004), constataram que a expressão de Bcl-x_L durante a diferenciação megacariocítica, em pacientes com TE, está diminuída na presença de TPO. Esse achado sugere que a desregulação da expressão de Bcl-x_L está ligada, ao menos em parte, a superprodução e diferenciação de plaquetas, visto que Bcl-x_L é essencial para regulação e limitação do processo de megacariocitopoes.

E em pacientes com NMPC, foi detectado aumento da expressão da proteína citoplasmática β -catenina nos megacariócitos (JAUREGUI et al., 2008). A ativação da via de sinalização Wnt pela β -catenina foi descrita como tendo um papel crítico na manutenção da célula tronco, principalmente com relação à sua capacidade de se multiplicar, mas não se diferenciar. Desta forma, tem sido sugerido que neoplasias hematológicas possam depender também da via Wnt/ β -catenina com relação a proliferação do clone maligno (DOMEN; WEISSMAN, 2000; MIKKOLA et al., 2003; ORKIN; ZON, 2002; LESSARD; SAUVAGEAU, 2003; PARK; QIAN; KIEL, 2003; JAUREGUI et al., 2008). Os resultados de Jauregui e colaboradores (2008) indicaram que a via Wnt/ β -catenina pode estar envolvida na megacariocitopoes na PV e TE, podendo também ser um marcador útil na diferenciação de PV e TE de outras Neoplasias Mieloproliferativas.

A desregulação do eixo SDF1/CXCR4 na linhagem megacariocítica, está envolvido na fisiopatologia da TE. O Fator Derivado de Célula Estromal (Stromal cell-derived factor 1 - SDF-1) e o Fator de Crescimento de Fibroblasto (Fibroblast Growth Factor - FGF-4)

promovem o retorno do megacariócitos para o nicho vascular, favorecendo a sobrevivência, maturação e liberação das plaquetas. CXCR4 está diminuído em 86% dos pacientes (SALIM et al., 2009).

Outras mutações estão sendo descritas mais recentemente, entre elas a mutação TET2 (TET oncogene family member 2; 4q24), que é encontrada em pacientes com NMPC JAK2V617F positivos e negativos, sendo a frequência aproximada de 16% em PV, 5% em TE, 17% em MF (DELHOMMEAU et al., 2009; TEFFERI, 2009). Os estudos têm demonstrado que as mutações no gene TET2 podem ocorrer antes ou após a aquisição da mutação no gene JAK2 (DELHOMMEAU et al., 2009; TEFFERI, VAINCHENKER, 2011). Outra mutação, no gene ASXL1, que pode contribuir para a regulação epigenética na hematopoese, tem sido detectada em cerca de 10% dos pacientes com NMPC e, relacionada inclusive com prognóstico na Leucemia Mielomonocítica Crônica (CARBUCCIA et al., 2009; GELSI-BOYER et al, 2010).

1.1.5. A mutação JAK2V617F e as NMPC

A mutação no gene que codifica a JAK-2 (V617F) é, sem dúvida, o achado fisiopatológico das NMPC mais importante dos últimos anos, visto que essa mutação está associada a um quadro clínico mais grave de NMPC (JAMES et al., 2005; BAXTER et al., 2005; LEVINE et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; ZHAO et al., 2005).

As mutações na JAK2 e em genes transdutores de sinais seriam responsáveis pelas alterações na sinalização da via JAK-STAT, a qual transduz sinais de receptores de citocinas e fatores de crescimento como Eritropoetina (EPO), Fator Estimulante de Colônia (CSF), Fator Estimulante de Colônia Granulocítica–Monocítica (GM –CSF), IL-3, Trombopoetina (TPO) e IGF-(1), imprescindíveis no desenvolvimento das células da linhagem mielóide

Pacientes com NMPC JAK2V617F positivos apresentam hematócrito mais elevado, maior nível de hemoglobina, menores níveis de eritropoetina, contagens de leucócitos e de neutrófilos maiores do que pacientes V617F negativos e maior risco de terem esplenomegalia e eventos trombóticos (REILLY, 2006; SPELETAS et al., 2007). Outros autores (CHEUNG et al., 2006; LUCIA et al., 2008; VANNUCCHI et al., 2007a e b) descreveram a correlação entre os altos níveis de hematócrito e a mutação JAK2V617F, enfatizando a idéia de que a mutação teria efeito no curso da doença.

JAK2 é uma proteína que se liga a parte intracitoplasmática dos receptores de citocinas do tipo 1 homodimérico e do tipo 1 e 2 heterodimérico pelo domínio FERM. (KISSELEVA et al., 2002; O'SHEA; GADINA; SCHREIBER, 2002; VAINCHENKER; DELHOMMEUAU; VILLEVALL, 2007). A ligação da citocina ao receptor induz a transfosforilação das JAK2 e, em seguida, a fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor, levando ao recrutamento e fosforilação das proteínas sinalizadoras PI3K, RAS e STAT5 (KISSELEVA et al., 2002; VAINCHENKER; DELHOMMEUAU; VILLEVALL, 2007) (Figura 1).

Figura 1. Via de sinalização de JAK-2 e a mutação V617F em Doenças Mieloproliferativas Crônicas, adaptado de Levine, 2007.

A porção quinase reside no terminal carboxil da proteína (domínio de homologia JH1), o qual é adjacente ao domínio pseudoquinase inativo cataliticamente, domínio de homologia JH2 que é o responsável pela inibição basal da atividade da JAK (KAUSHANSKY, 2007).

A mutação que ocorre na JAK2 é pontual e consiste na substituição da base nucleotídica G por T na posição 1849 do gene, o que conduz a troca de valina pela

fenilalanina no domínio pseudoquinase JH2 da sequência polipeptídica da JAK-2. Com a alteração, esse domínio perde a função de regular negativamente o domínio quinase JH1 ocasionando aumento da atividade de quinase de JAK2 e hiperresponsividade das células à sinalização de citocinas (KHWAJA, 2006; O'SHEA; GADINA; SCHREIBER, 2002), pelas vias de sinalização STAT5, MAPK/ERK e PI3K/AKT (VAINCHENKER; et al., 2007).

Originalmente, a mutação JAK2 (V617F) foi detectada em progenitores mielóides (BAXTER et al., 2005), no entanto há evidências de que ela ocorra também nos no progenitor linfomielóide de pacientes com PV e MF (BOGANI et al., 2007; DELHOMMEAU et al., 2007). Neste estudo de Bogani et al, 2007, pacientes com MF apresentaram mais progenitores linfomielóides com a mutação quando comparados aos pacientes com PV, fato que poderia explicar como uma mutação no gene da JAK2 (JAK2V617F) seria capaz de originar três desordens distintas, a PV, TE e a MF. Os mesmos autores não excluem a possibilidade de que a origem dessas diferentes NMPC esteja relacionada ao aparecimento de mutações adicionais nas células progenitoras (BOGANI et al., 2007; DELHOMMEAU et al., 2007).

Na tentativa de se elucidar como uma mutação poderia conduzir a três doenças diferentes - PV, TE e MF - várias hipóteses foram postuladas, sendo elas: a presença de mutações adicionais; diferentes estágios de diferenciação em que a mutação ocorre, porcentagem de alelos mutados, variações individuais e genéticas dos pacientes (PASSAMONTI, RUMI 2009).

Diferenças significativas na porcentagem de alelos mutados têm sido descritas, sendo esta maior em PV do que TE (PASSAMONTI et al., 2008) e nas células progenitoras de MF do que PV (KOTA; CACERES; CONSTANTINESCU, 2008). Essas observações conduzem ao desenvolvimento de um protótipo de patogênese das NMPC de múltiplos passos. Nesse modelo, um clone heterozigoto para a mutação originaria células homozigotas por recombinação mitótica. A heterogeneidade do nível de mutação JAK2V617F sugere seus diferentes papéis nas NMPC, com uma expansão mais rápida do clone mutado e a prevalência de homozigose (>50%) em PV (LUCIA et al., 2008).

Alterações genômicas, incluindo mutação pontual, deleção e dissomia uniparental podem cooperar para o desenvolvimento da NMPC, como por exemplo, dissomia uniparental 1p e 9p; mutação JAK2 e MPL, deleção dos genes RB e NF1 (KAWAMATA et al., 2008).

Várias outras mutações na JAK2 têm sido relatadas em pacientes JAK2V617F negativos, mais precisamente no éxon 12 da JAK2 e afetam aminoácidos localizados no domínio pseudoquinase, sugerindo mecanismo de ação semelhante (KAROW et al., 2008; SCOTT et al., 2007).

Atualmente, o maior enfoque dos estudos tem sido na relação da mutação JAK2V617F com aspectos clínico-laboratoriais dos pacientes. Desta forma, juntamente com fatores fisiológicos e genéticos, o fenótipo da doença poderia ser determinado pela porcentagem de alelos mutados (LARSEN et al., 2007). Maiores porcentagens de alelos mutados estariam associadas ao aumento de expressão de genes das vias relacionadas a JAK-2, como os níveis de PRV-1 (KRALOVICS et al., 2003; LARSEN et al., 2007; LIPPERT et al., 2006), ligado ao prognóstico e a resposta à terapia (CAMPBELL et al., 2006; HUSSEIN et al. 2007; SIRHAN, 2008).

A enzima JAK parece participar na ativação do processo de apoptose celular, porém seu papel neste contexto foi pouco explorado. Sepúlveda et al. (2007), sugeriram que a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-x_L e Bcl-2, em células hematopoéticas, seria regulada pela via de sinalização JAK/STAT.

Outra mutação somática, detectada em 5% dos pacientes com MF e 1% de TE (GUGLIEMELLI et al., 2007; MESA et al., 2007), foi a mutação do gene do receptor de TPO, MPL, localizado no cromossomo 1p34. As mutações descritas MPLW515L, em que há troca de G por T no nucleotídeo 1544 e substituição triptofano por leucina no códon 515 da região transmembrana do receptor (TEFFERI, 2009a) e MPLW515K, do mesmo modo que a mutação da JAK2 (V617F) resulta em ativação constitutiva da via JAK-STAT (PIKMAN et al., 2006; GUGLIEMELLI et al., 2007; PIKMAN, 2006). Lasho et al. (2006) demonstraram que a porcentagem de MPL 515L/K e de JAK2 V617F permanecem constantes durante o curso da doença e que as mutações podem coexistir (LASHO et al., 2006). Mais recentemente, outras mutações somáticas no gene MPL (W515S e S505N) têm sido descritas com prevalência de 4% e TE e 9% em TE JAK2V617F. (TEFFERI, 2009a).

Nesse contexto, estudos concernentes à via de ativação JAK2/STAT e, de vias relacionadas a esse processo, como o de apoptose celular, contribuiriam para a elucidação da fisiopatologia e para a descrição de potenciais alvos terapêuticos para a MF e TE.

1.2. Apoptose

A apoptose é uma forma de morte celular programada, geneticamente regulada, que ocorre quando a célula é exposta a determinados estímulos fisiológicos, patogênicos ou citotóxicos (THOMADAKI; SCORILAS, 2006).

As células em apoptose apresentam características morfológicas típicas, como redução do volume celular, pregas na membrana citoplasmática, condensação e fragmentação do DNA, manutenção da integridade das organelas (FESTJENS et al., 2006).

A apoptose pode ser desencadeada pela ativação intracelular de proteases capazes de clivar outras proteínas que possuam resíduos de ácido aspártico e cisteína em seu sítio ativo. Essas proteases são denominadas caspases (cysteine-aspartic-acid-proteases) e, até o momento, foram descritas quatorze (BOATRIGHT; SALVESEN, 2003). As caspases relacionadas a apoptose podem ser subdivididas funcionalmente em caspases executoras (caspase-3, -6 e -7) e caspases iniciadoras ou reguladoras (caspase-2, -8, -9 e -10). Estas últimas se encarregam da ativação das executoras. As caspases localizam-se no citoplasma na forma inativa (zimogênios) e são ativadas por clivagem e/ou dimerização. Quando ativas atuam em seus diversos substratos no citoplasma e no núcleo celular, resultando na morte da célula por apoptose.

As vias de sinalização principais responsáveis pela ativação da apoptose são via extrínseca (via de receptores de morte celular, Figura 2) e intrínseca (via mitocôndria, Figura 3).

Figura 2. Via extrínseca da apoptose celular, adaptada de Jin; El-Deiry, 2005.

Figura 3. Via Intrínseca da apoptose adaptada de Jin; El-Deiry, 2005.

A via extrínseca é ativada quando receptores de morte da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF), tais como TNFR1 e TNFR2 (TNF *receptors*), CD95 (Apo-1/Fas) e TRAIL R1/DR4 e TRAIL R2/DR5 (TNF *related apoptosis-inducing ligand receptors*), são estimulados pela ligação com seus agonistas específicos. Essa ligação promove a trimerização do receptor, com aproximação das caudas intracitoplasmáticas, que contém uma região denominada domínio de morte (*Death Domain – DD*). Desta forma, são recrutadas proteínas adaptadoras que contém o mesmo domínio de morte DD (interação homotípica) e o domínio efetor de morte DED (*Death Effector Domain*), responsável por recrutar caspases iniciadoras, como a caspase-8, e promover a formação da estrutura multi-molecular denominada DISC (*Death-Inducing Signalling Complex*), constituída, portanto pela proteína adaptadora, caspase-8 e proteínas reguladoras. A oligomerização da caspase-8 durante a formação do DISC induz a sua ativação por auto clivagem e, em seguida, a ativação de caspases executoras, como a caspase-3 e 7. O protótipo de ativação da via extrínseca da apoptose pode ser representado pelo estímulo da via Fas-FasL. Nesse caso, a ligação da molécula Fas com o seu agonista (Fas-L) promove o recrutamento da molécula adaptadora FADD (*Death Domain / Death Effector Domain - containing adaptor protein*) e da caspase 8, formando o DISC. Este último possibilita a ativação das caspases efetoras -3, -6 e -7 e, por consequência, da cascata

de morte celular (JIN; EL-DEIRY, 2005). Outro conjunto de ligantes e receptores importantes para a ativação da apoptose por receptores de morte são os já mencionados TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), membro da superfamília do TNF (LEBLANC; ASHKENAZI, 2003) e seus receptores DR4 e DR5 (Death Receptor 4 e 5).

O papel fisiológico da molécula TRAIL não está elucidado, mas vários trabalhos têm mostrado sua atividade potente e específica como indutora de apoptose em linhagens celulares neoplásicas (ZEUNER et al., 2006; ASHKENAZI et al., 1999; WALCZAK et al., 1999; LEBLANC; ASHKENAZI, 2003). A terapia com TRAIL é empregada no tratamento experimental de tumores sólidos e casos de resistência a essa terapia já foram relatados (HAN; HOU; GOLDSTEIN, 2008; ALMASAN; ASHKENAZI, 2003). Os possíveis mecanismos envolvidos na resistência a essa terapia são mudanças na expressão de proteínas anti-apoptóticas como *c-flip* e *mcl-1* (WANG et al., 2008). Deligezer; Dalay (2007) descreveram que 42% das células mononucleares obtidas de pacientes com LMC não expressavam *dr4* ou *dr1*, enquanto que as obtidas de controles apresentavam padrão específico de expressão de *dr1*, *dr2* e *dr4* (DELIGEZER; DALAY, 2007).

A alteração da expressão de receptores de morte em neoplasias foi correlacionada com o estágio do tumor e a sobrevida do paciente. Por exemplo, a expressão de *dr4* mostrou correlação positiva com o grau de tumor de mama em pacientes com carcinoma ductal invasivo (SANLIOGLU et al., 2007). Além disso, altos níveis de *dr5* se correlacionaram a menor sobrevida dos pacientes (COOPER et al., 2008).

A via intrínseca ou mitocondrial pode ser iniciada por diversos estímulos apoptogênicos, como quimioterápicos, que causam danos ao DNA, ruptura de microtúbulos e deficiência ou ausência de fatores de crescimento celulares (SALVESEN; RENATUS, 2002). Estes estímulos desencadeiam a liberação de fatores apoptogênicos do espaço interno da mitocôndria, tais como Citocromo c, Smac (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*) / DIABLO (*Direct Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Binding Protein with Low PI*), Omi/Htr 2, AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) e Endonuclease G (CANDE et al., 2002; SAELENS et al., 2004). O citocromo c liberado liga-se ao Apaf-1 (*Apoptosis protease-activator factor 1*) e a procaspase-9, formando o complexo denominado apoptossomo. A caspase-9 é ativada, promovendo a ativação da caspase-3 e da cascata proteolítica. Os fatores Smac/DIABLO neutralizam o efeito das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), como c-IAPs e Survivina, e amplificam o sinal apoptótico. Acredita-se que AIF e Endonuclease G contribuam para modificações nucleares como condensação da cromatina (FULDA; DEBATIN, 2006).

Assim sendo, as duas vias, intrínseca e extrínseca, convergem para a ativação da Caspase-3 e, subsequentemente, de outras proteases e nucleases que comandam os eventos terminais da apoptose (JIN; EL-DEIRY, 2005). O passo final da apoptose ocorre com formação dos corpos apoptóticos e fagocitose destes devido a exposição anormal da molécula de Fosfatidilserina (JIN; EL-DEIRY, 2005; SAVILL; FADOK, 2000).

Importante ressaltar que o processo de apoptose celular é controlado por uma complexa rede regulatória (JIN; EL-DEIRY, 2005). Nesse sentido, a via extrínseca é regulada principalmente pelas moléculas denominadas c-Flip (*caspase-8-like (FLICE)-inhibitory proteins*), que possuem um domínio muito semelhante ao da caspase-8, porém sem atividade catalítica e FAIM (Fas apoptosis inhibitory molecule). Assim, c-Flip ao se ligar ao FADD é capaz de impedir competitivamente a ligação da caspase-8, inibindo a formação do DISC e consequentemente a ativação do processo de apoptose (FESTJENS et al., 2006). FAIM é antagonista do receptor FAS, detectado em níveis aumentados em células B resistentes à morte e funciona como um inibidor de morte celular induzida por Fas e TRAIL. FAIM é conservado entre as espécies e expresso na maioria dos tecidos (SEGURA et al., 2007; SOLE et al., 2004; SCHENEIDER et al., 1999; ROTHSTEIN et al., 2000).

A via intrínseca é regulada principalmente pelas proteínas pertencentes à família Bcl-2, cujos membros são categorizados em proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bok, Bik, BMF, Boo, Bcl-x_S, PUMA e NOXA) (THOMADAKI; SCORILAS, 2006). As moléculas pró-apoptóticas são divididas, conforme os domínios que possuem e função, em dois subgrupos: proteínas efetoras (Bak e Bax) e proteínas BH3-only (Bad, Bik, Bim, NOXA e PUMA, por exemplo) (CHIPUK; GREEN, 2008). Estas últimas foram denominadas BH3-only por conterem apenas o domínio BH3, enquanto as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 possuem os domínios BH1 a BH4. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 estão localizados na membrana externa da mitocôndria e na membrana do retículo endoplasmático e do núcleo (DE JONG et al., 1994; HOCKENBERY et al., 1990; KRAJEWSKI et al., 1993; NGUYEN et al., 1993).

O principal papel das proteínas da família Bcl-2 é estabilizar a membrana mitocondrial, prevenindo a liberação do citocromo c, sua subsequente ligação ao Apaf-1 e a apoptose (CORY; ADAMS, 2002; KLUCK et al., 1997; YANG et al., 1997). As proteínas pró-apoptóticas localizam-se no citosol ou no citoesqueleto nas células saudáveis. Após um sinal de morte, elas normalmente interagem com as proteínas anti-apoptóticas, inibindo-as, levando à formação de poros e iniciando apoptose celular. (KIRKIN et al., 2004).

As interações entre as proteínas da família Bcl-2 que resultam em ativação ou inibição da apoptose parecem ser realizadas por meio de duas formas: (1) neutralização e (2) ativação direta. Na neutralização proteínas anti-apoptóticas teriam suas ações bloqueadas pelas chamadas proteínas BH3 *only*, promovendo a liberação das proteínas pró-apoptóticas efetoras (Bax e Bak) (revisado em CHIPUK; GREEN, 2008). Porém, evidências recentes sugerem que a inibição das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 não seria suficiente para a ocorrência da apoptose, sendo necessário a presença de outros integrantes, como Bid ou Bim, para ativar as moléculas pró apoptóticas Bax e/ou Bak (SKOMMER; WLODKOWIC; DEPTALA, 2007). Este seria o segundo modelo denominado de ativação direta, no qual as proteínas BH3-only Bid e Bim são ativadores diretos de Bax e Bak e demais proteínas BH3-only, como por exemplo, Bad e NOXA, seriam sensibilizadores ou derepressoras do processo (revisado em CHIPUK; GREEN, 2008).

Nesta mesma revisão, os autores sugerem a existência do complexo Bak/Mcl-1, inativo em células saudáveis e que interage com Bcl-x_L. (revisado em CHIPUK; GREEN, 2008). A ativação desse complexo seria ocasionada por estímulo pró-apoptótico, o qual levaria ao deslocamento de Mcl-1 do complexo por ação do NOXA e o deslocamento de Bcl-x_L pela molécula Bim (GÉLINAS; WHITE, 2005), culminando com a apoptose celular.

O balanço entre moléculas pró e anti-apoptóticas garantem a sobrevivência das células de vida longa e a renovação de células de vida curta, incluindo nessas últimas as células da medula óssea, timo e tecido linfóide (REED; PELLECCIA, 2005). Alterações desse equilíbrio podem culminar com o surgimento de várias doenças neurodegenerativas (Ex: Doença de Huntington, de Alzheimer e de Parkinson), auto-imunes (Ex: Lupus Eritematoso Sistêmico) e neoplásicas (Ex: Linfoma de Célula B, Leucemias Agudas e Crônicas, cânceres de próstata, cólon, mama e rim). As doenças neurodegenerativas estão relacionadas a potencialização do processo de apoptose, enquanto doenças auto-imunes e neoplasias estão relacionadas à sua inibição (THOMADAKI; SCORILAS, 2006).

Com relação às desordens hematopoéticas, Castro et al. (2005) o aumento da expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *al*, *mcl-1* e *flip* em pacientes portadores de LMC e, a expressão desses genes aumenta com a progressão da doença, contribuindo para a resistência das células leucêmicas à apoptose e refratariedade dos pacientes ao tratamento nas fases mais avançadas da LMC.

Nossa hipótese é a de que a mieloproliferação presente na TE e MF seja decorrente do aumento da proliferação e/ou da redução da apoptose nas células progenitoras ou precursoras e circulantes. A desregulação da expressão dos genes pró- e anti-apoptóticos pode ocasionar a

resistência das células à apoptose, culminando com o acúmulo das células da linhagem mielóide e evolução da doença. Já foram descritas para as NMPC, alterações em algumas moléculas que participam da regulação da apoptose. Zeuner et al. (2006), demonstraram que há aumento da resistência das células à apoptose devido a elevação da expressão de FLIP em precursores eritróides na PV e, Zhang et al. (2004) descreveram diminuição da expressão de Bcl-x_L de forma precoce durante o processo de diferenciação de megacariócitos induzida por trombopoetina a partir de células CD34⁺ de pacientes com TE. Esses dados sugerem que a alteração da expressão poderia explicar, ao menos em parte, a degeneração precoce de megacariócitos com superprodução e diferenciação de plaquetas, já que Bcl-x_L é essencial para a megacariocitopoese.

Apesar de alterações da expressão de Bcl-x_L já terem sido descritas nos pacientes com PV e TE, nenhum outro estudo avaliou a expressão dos genes envolvidos na regulação da apoptose celular em pacientes com MF e TE. Assim como para Leucemia Mielóide Crônica, Leucemia Mielóide Aguda e Linfoma de Célula B, alterações nesse processo podem ser igualmente relacionadas a fisiopatologia, ao prognóstico e a resposta ao tratamento em pacientes (CAMPOS et al., 1993; KARAKAS et al., 1998).

O presente estudo objetivou contribuir para o melhor conhecimento da fisiopatologia da MF e da TE, além de fornecer parâmetros mais específicos para o estabelecimento do prognóstico e alvos moleculares que possibilitem o desenvolvimento de terapia curativa para a doença.

1.3. MicroRNA, Apoptose e Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas

Os microRNAs (miRNA) são pequenos RNA de fita simples, que contém aproximadamente 22 nucleotídeos e não codificam proteínas (ESQUELA- KERSCHER; SLACK, 2006). miRNA controlam centenas de “genes alvo” e dessa forma regulam a proliferação, diferenciação e apoptose celular. A expressão aberrante dessas moléculas parece contribuir para o desenvolvimento de neoplasias, doenças auto-imunes e neurodegenerativas (CALIN et al., 2008; SONOKI et al., 2005; ESQUELA- KERSCHER; SLACK, 2006).

A biogênese do miRNA envolve três processos, transcrição do miRNA primário (primiRNAs), transformação do miRNA precursor no núcleo e geração dos miRNAs maduros no citoplasma. Pri-miRNA é um transcrito derivado da RNA polimerase II cuja estrutura

terciária forma “*stem loops*” que são clivados pela maquinaria do complexo Drosha formando pré-miRNAs de 60-100 nucleotídeos (nt) que posteriormente, após translocação para o núcleo, serão processados pela enzima Dicer, RNA polimerase III, formando miRNAs maduros de aproximadamente 22 nt. Após a clivagem a fita “*antisense*” (termodinamicamente mais favorável) do microRNA é incorporada ao complexo RISC que promoverá a ligação ao RNAm alvo (BEEZHOLD; CASTRANOVA; CHEN, 2010) (Figura 4).

Figura 4. Processamento do miRNA (adaptado de Beezhhold; Castranova; Chen, 2010).

Estudos têm descrito genes supressores de tumor, como o p53 e proteínas reguladoras da apoptose como alvos de microRNAs (HE et al., 2007; HANNON, 2007). A via da p53 tem sido bastante explorada em pesquisas da patogênese de tumores por ser um conhecido alvo de microRNAs. Sua ativação conduz a célula à apoptose mediada por Puma e Noxa, interrupção do ciclo celular, bloqueio da angiogênese e ativação do reparo do DNA (HE; HE; HANNON, 2007). Portanto, microRNAs que inibam a transcrição dessa proteína interferem no reparo do DNA e inibem apoptose celular.

Outra neoplasia investigada quanto a expressão de microRNAs é a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC). Na LLC, a deleção dos miR-15a e miR-16-1 ocasiona o aumento da expressão de Bcl-2, o que provavelmente participa dos eventos que conduzirão a transformação da célula normal em leucêmica nessa doença (CIMMINO et al., 2005). Careta

(2007) relatou que a “*superexpressão*” das moléculas *ezrin* e *c-flip*, na LLC, estavam ligadas a expressão de miR-96, miR-183 e miR-20. Esses autores sugerem que esses miRNAs regulam a expressão gênica de *c-flip* e *ezrin*, potencializando a proliferação e inibindo a apoptose dos linfócitos leucêmicos do tipo B de pacientes com LLC. Guglielmelli et al. (2007) descreveram vários microRNAs diferencialmente expressos na MF e Bruchova et al. (2007) relataram a expressão anormal de microRNAs também na PV.

Considerando essas pesquisas e a detecção de alterações na expressão dos genes relacionados à apoptose, inclusive o próprio *bcl-2*, por nosso grupo em pacientes com MF, nossa hipótese é de que pacientes com TE e MF apresentam níveis alterados de expressão de microRNAs que possuem como alvo genes que regulam a apoptose.

Desta forma, foi avaliada nesse estudo a expressão de microRNAs, que têm como alvo genes reguladores da apoptose que se mostraram diferencialmente expresso na MF, TE. Essa investigação contribui para o relato de novos mecanismos que regulem a expressão dos genes que controlam a apoptose nas NMPC, auxiliando a compreensão da fisiopatologia da TE e da MF, o que futuramente poderá auxiliar para a descrição de alvos para a terapia dessas doenças.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão de microRNAs, das moléculas que compõem as vias intrínseca e extrínseca da apoptose celular, além do funcionamento da maquinaria apoptótica em pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.

2.2. Objetivos Específicos

1. Quantificar a expressão de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticas em células precursoras CD34⁺ e leucócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com TE e MF;
2. Verificar a sensibilidade dos linfócitos dos pacientes com TE e MF aos agentes apoptogênicos;
3. Determinar a expressão de microRNAs, cujos alvo sejam moléculas reguladoras da apoptose (apoptomirs) e correlacionar esses dados à expressão dos genes pró e anti-apoptóticos nos pacientes com MF e TE;
4. Correlacionar os resultados obtidos com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes, como hemograma, esplenomegalia, positividade para mutação JAK2V617F e expressão do gene PRV-1.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram avaliados 12 pacientes com Mielofibrose Primária, com idade média de 61,7 anos (faixa etária: 41-80 anos), três do sexo feminino e nove do sexo masculino e todos de cor branca e, 26 pacientes com TE, com idade média de 60,2 anos (faixa etária: 35-80 anos), 21 do sexo feminino e cinco do sexo masculino, três negros e 23 brancos. Os pacientes foram provenientes do Hospital Brigadeiro de São Paulo e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

O diagnóstico foi realizado conforme os critérios de diagnóstico da Organização mundial da Saúde descritos no item 1 da Introdução (Tabelas 2 e 3), e não estavam utilizando medicação. As características demográficas dos pacientes estão apresentadas na tabela 4.

O grupo controle foi composto por 37 indivíduos saudáveis, doadores voluntários de sangue periférico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sendo 14 do sexo masculino e 23 do sexo feminino, um negro e 36 brancos, com idade média de 58,5 anos (faixa etária: 31-80 anos) e 23 doadores de medula óssea do HCFMRP-USP, 12 do sexo masculino e 11 feminino, 18 brancos, um descendente de asiático, dois negros e dois mulatos, com média de idade de 35,9 anos (faixa etária: 14-54 anos). As características demográficas dos controles estão descritas nas tabelas 5 e 6.

A seleção e o acompanhamento clínico dos pacientes estiveram sob responsabilidade das hematologistas Profa. Dra. Belinda Pinto Simões (HCFMRP-USP), Dra. Maria Aparecida Zanichelli e Dra. Elizabeth Xisto Souto (Hospital Brigadeiro). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos dos referidos hospitais (Ofício nº 3459/2008 CEP/SPC; aprovado 23/09/2008, conforme processo HCRP nº 9298/2008, anexo 1).

Não foi possível parear controles e pacientes com relação à idade para o estudo em células CD34⁺ de medula óssea, pois os comitês de ética apenas permitem a coleta de medula óssea de doadores durante o procedimento de coleta para transplante de medula óssea.

Tabela 4. Características demográficas dos pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Cor da Pele
MF01	71	F	B
MF02	41	M	B
MF03	64	M	B
MF04	52	M	B
MF05	68	M	B
MF06	55	M	B
MF07	61	F	B
MF08	59	F	B
MF09	58	M	B
MF10	62	M	B
MF11	69	M	B
MF12	80	M	B
TE1	41	F	B
TE2	66	M	B
TE3	40	F	B
TE4	58	F	B
TE5	60	M	B
TE6	68	F	B
TE7	54	M	B
TE8	66	F	B
TE9	59	F	B
TE10	62	F	N
TE11	58	F	N
TE12	73	F	B
TE13	50	F	B
TE14	67	M	B
TE15	51	F	B
TE16	75	F	B
TE17	79	F	N
TE18	80	F	B
TE19	70	F	B
TE20	59	F	B
TE21	35	F	b
TE22	71	F	B
TE23	53	F	B
TE24	44	M	B
TE25	50	F	B
TE26	77	F	B

F: sexo feminino, M: sexo masculino, B: branco, N: negro.

Tabela 5. Características demográficas dos doadores de medulas ósseas do grupo controle (MOC).

Doador	Idade (anos)	Sexo	Cor da Pele
MOC1	29	M	N
MOC2	14	F	B
MOC3	30	M	B
MOC4	36	M	B
MOC5	54	M	B
MOC6	53	F	B
MOC7	40	M	B
MOC8	42	M	B
MOC9	39	M	B
MOC10	45	M	B
MOC11	29	M	B
MOC12	37	M	B
MOC13	45	F	B
MOC14	48	F	B
MOC15	38	M	B
MOC16	44	F	N
MOC17	40	F	Mul
MOC18	37	M	A
MOC19	29	F	B
MOC20	21	F	B
MOC21	24	F	Mul
MOC22	32	F	B
MOC23	20	F	B

F: sexo feminino, M: sexo masculino, B: branco, N: negro; Mul: mulato; A: descendente de asiático.

Tabela 6. Características demográficas dos doadores saudáveis de sangue periférico do grupo controle (SPC).

Doador	Idade (anos)	Sexo	Cor da Pele
SPC01	80	F	B
SPC 02	41	F	B
SPC 03	41	F	B
SPC 04	44	M	B
SPC 05	59	M	B
SPC 06	60	F	B
SPC 07	55	F	B
SPC 08	50	M	B
SPC 09	68	F	B
SPC 10	60	M	B
SPC 11	49	F	B
SPC 12	52	M	B
SPC 13	66	F	B
SPC 14	72	M	B
SPC15	38	F	B
SPC16	60	F	B
SPC17	31	F	N
SPC18	65	M	B
SPC19	60	F	B
SPC20	52	M	B
SPC21	51	M	B
SPC22	61	F	B
SPC23	76	F	B
SPC24	69	F	B
SPC25	77	F	B
SPC26	54	F	B
SPC27	76	F	B
SPC28	78	F	B
SPC29	71	M	B
SPC30	71	F	B
SPC31	58	M	B
SPC32	70	M	B
SPC33	54	F	B
SPC34	48	F	B
SPC35	45	M	B
SPC36	47	F	B
SPC37	57	M	B

SPC: Sangue periférico controle; F: sexo feminino, M: sexo masculino, B: branco, N: negro.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção de células mononucleares, leucócitos e células precursoras hematopoéticas

Foram colhidos 40 mL de sangue periférico e 15 mL de medula óssea dos pacientes com MF e TE e 20 mL de sangue periférico dos controles da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Os doadores de medula óssea fazem parte do grupo de doadores de medula óssea do setor de Transplante de Medula Óssea do HCFMRP-USP e, portanto constituem grupo distinto daqueles dos doadores de sangue periférico da FCFRP-USP, sendo que foram colhidos desses indivíduos 15 mL de medula óssea.

Os leucócitos e as células mononucleares foram separados pelo método de Haes-Esteril (Voluven[®], Frasenius Kabi, Campinas, Brasil) e Ficoll-Hypaque (BOYUM, 1976), respectivamente.

Na técnica de Haes-Esteril, o sangue total foi misturado ao Haes-esteril na proporção de 20 de sangue e para 8 partes do reagente, homogeneizado e decantado por 90 minutos. O sobrenadante foi colhido, centrifugado a 1810 x g e as hemácias presentes no precipitado lisadas com 2 mL de tampão de lise ACK (8,3 g/L de NH₄Cl, 1 g/L de KHCO₃ e 0,036 g/L de EDTA). Os leucócitos obtidos foram utilizados nos ensaios subsequentes de expressão gênica e *Western-Blot*.

No método de Ficoll-Hypaque, foram adicionados ao tubo cônico de 50 mL, 13 mL de Histopaque[®] (densidade, 1.077) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) e 30 mL de sangue ou medula óssea diluídos (1:3) em tampão PBS- ACD 0,06%, pH 7,4 (ACD, JP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O tubo foi centrifugado a 500x g, por 30 minutos a 22°C, e a camada que contém as células mononucleares foi separada. Essas células foram lavadas com tampão PBS-ACD, centrifugando-se a 453x g por 10 minutos e ressuspensas em 1 mL de PBS-ACD para a determinação do número de células por mL em câmara de Neubauer.

As células mononucleares da medula óssea foram isoladas pelo método de Ficoll-Hypaque, lavadas em tampão PBS-ACD acrescido de albumina 0,05% (InLab, São Paulo, SP, Brasil). Ressuspensas nesse mesmo tampão as células mononucleares medulares foram submetidas à separação das células progenitoras CD34 positivas por coluna imunomagnética (MidiMACS[®]) utilizando-se anticorpo monoclonal conjugado a *beads* (MACS, Miltenyi

Biotech, Bergisch Gladbach, Alemanha). Para a marcação das células, foram empregados 100µl de anticorpos para 3×10^8 células, conforme protocolo do fabricante e a suspensão celular eluída por duas colunas subsequentes para aumentar a pureza. As células obtidas foram contadas e a pureza da população CD34⁺ foi detectada por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpo anti-CD34 humano conjugado com ficoeritrina (BD Pharmingen™, San Diego, Califórnia, EUA), anti-CD14 humano conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen™, San Diego, Califórnia, EUA) no citômetro de fluxo FACSsort (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA).

As células-tronco hematopoéticas da medula óssea e os leucócitos totais foram congelados em 1 mL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) para posterior extração de RNA e proteínas. Leucócitos totais do sangue periférico na concentração de 1×10^6 por 100 µl de tampão de amostra (5% de mercaptoetanol, 4% de SDS, 20% de glicerol e 100mM Tris-CL-pH 6.8), fervidos a 100°C por 5 minutos e armazenados a -20°C para os ensaios de *Western-Blot*.

As células mononucleares do sangue periférico foram submetidas aos ensaios de indução de apoptose celular com agentes apoptogênicos.

3.2.2. Determinação do Hemograma dos Pacientes

O eritrograma, leucometria e contagem de plaquetas dos pacientes foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. O analisador hematológico utilizado foi o Cell Dyn 3500SL.

3.2.3. Detecção da mutação JAK2 V617F no sangue periférico

A detecção da mutação V617F do gene da JAK2 e a determinação da porcentagem de alelos mutados foram feitas pelo laboratório de referência Fleury Medicina e Saúde pela técnica de discriminação alélica utilizando PCR em tempo real.

O ensaio utilizou duas sondas fluorogênicas (MGB) para detecção a mutação G → T no éxon 14 do gene JAK2. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (*forward*:

5'- GCAGCAAGTATGATGAGCAAGCT-3'; reverse: 5'- GCATTAGAAAGCCTGTAGTTTTACTTAC -3') e das sondas MGB foram desenhadas utilizando-se o software Primer Express®, versão 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sondas de hibridização foram desenhadas com dois diferentes fluorocromos para permitir a discriminação alélica em um único tubo. Uma delas continha FAM (6-carboxifluorescein) e tinha como alvo o alelo selvagem (5'-6-FAM-TGGAGTATGTGTCTGTGGA-3') e a outra para o alelo mutante tinha como fluorocromo o reporter VIC (6-carboxyrhodamine 6G) (5' -VIC-TGGAGTATGTTTCTGTGGAG -3'). Os oligonucleotídeos foram sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) e as sondas foram sintetizadas pela Applied Biosystems. A amplificação por PCR em tempo real foi feita utilizando-se o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em uma reação com volume de 12,5 µL contendo 0,3 µM de cada primer, 0,2 µM de cada sonda e DNA. O ciclo utilizado foi: 50°C por 2 minutos para ativação da Uracil-N-Glicosilase (UNG), 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no equipamento Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). Cada ensaio de PCR incluiu um controle negativo.

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

$$\% \text{ mutação JAK2V617F} = \text{Rn mutante} / (\text{Rn mutante} + \text{Rn selvagem})$$

3.2.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

Os leucócitos e as células progenitoras dos pacientes foram lisados e o RNA-mensageiro obtido purificado com o uso de uma mistura de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol®, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), conforme protocolo do fabricante. O RNA foi recuperado da fase aquosa pela adição de clorofórmio e centrifugação, seguida de precipitação com isopropanol e nova centrifugação. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspensão em 13 µL de água livre de RNases e DNases. A concentração de RNA total foi quantificada em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm.

O RNA extraído das células foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para determinação de sua qualidade e integridade (Figura 5). A eletroforese em gel de agarose foi realizada a corrente elétrica de 80 Volts durante 50 minutos e as bandas 28S, 18S e 5S de RNA foram visualizadas em transiluminador UV devido à incorporação de brometo de etídio (0,5µg/mL). Após a constatação da integridade e qualidade do RNA, sem contaminações por DNA ou degradação, o mesmo foi empregado na síntese de cDNA por transcrição reversa.

Figura 5. Exemplo de gel de agarose 1% com RNA extraídos de amostras de sangue periférico de pacientes e controles. Observa-se a visualização das bandas 28S, 18S e 5S do RNA.

Para obtenção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo utilizado 1µg de RNA por reação e o seguinte ciclo: 25°C por 10 minutos e a 37°C por duas horas no equipamento Mastercycler® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Os cDNA dos pacientes e controles foram utilizados nos ensaios de PCR em tempo real. Para tanto, oligonucleotídeos (*primers*) específicos foram desenhados para a amplificação dos genes pró- (*fas*, *fas-L*, *nox*, *bok*, *bax*, *bad*, *bak*, *bim_{EL}*, *bid*, *bcl-2*, *tril*, *dr4* e *dr5*) e anti-apoptóticos (*a1*, *mcl-1*, *bcl-w*, *bcl-x_L*, *bcl-2*, *CIAP-1*, *CIAP-2*, *c-flip* e *faim*) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) (Tabela 7). Os programas utilizados no processo de amplificação das amostras foram padronizados durante o desenvolvimento do projeto (Tabela 8). Foram empregados como controle da qualidade da amplificação e síntese de cDNA os genes “housekeeping” (genes endógenos) *β-actina* e *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* (GAPDH). Os cDNA dos pacientes foram amplificados e quantificados por real time PCR utilizando-se o Kit SybrGreen Quantitect® (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA) e o aparelho ABIPrism 7700® (Applied

Biosystems[®], Foster City, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos pelos $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que é calculado considerando-se a razão entre o gene testado e o gene endógeno (média geométrica do *gapdh* e β -actina) em relação às amostras controles (calibradores).

A determinação da expressão dos genes *PRV-1*, *XIAP* e *survivina* foi feita por PCR em tempo real utilizando-se “primers” e sondas inventoriados (*PRV-1* -Hs00360669_m1; *survivina* (BIRC5) -Hs00153353_m1) e *XIAP* (Hs00236913_m1) (Applied Biosystems[®], Foster City, Califórnia, EUA) e o ciclo utilizado foi: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Como gene endógeno para o esses três genes alvos foi utilizado o *gapdh* (GAPDH -Hs99999905_m1).

Tabela 7. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos cDNAs das moléculas envolvidas na apoptose celular, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento (TA).

Oligonucleotídeo	Sequências (5'→3')	Tamanho do Produto (pb)	TA (°C)
<i>bax</i>	F: CCC TTT TGC TTC AGG GTT TC R: TCT TCT TCC AGA TGG TGA GTG	501	56
<i>bad</i>	F: CCG AGT GAG CAG GAA GAC TC R: GGT AGG AGC TGT GGC GAC T	209	60
<i>bak</i>	F: TCT GGC CCT ACA CGT CTA CC R: ACA AAC TGG CCC AAC AGA AC	201	60
<i>bid</i>	F: GCT TCC AGT GTA GAC GGA GC R: GTG CAG ATT CAT GTG TGG ATG	203	62
<i>bik</i>	F: TCT GCA ATT GTC ACC GGT TA R: TTG AGC ACA CCT GCT CCT C	169	60
<i>bok</i>	F: TGG CAC TCA GGA GAT ACA GC R: ATT ACC ACC CCT ACC CTC CA	195	59
<i>bim_{EL}</i>	F: GCC CCT ACC TCC CTA CAG AC R: AAG ATG AAA AGC GGG GAT CT	152	59
<i>nox</i>	F: AGC TGG AAG TCG AGT GTG CT R: ACG TGC ACC TCC TGA GAA AA	167	54

Continua

Conclusão

Oligonucleotídeo	Sequências (5'→3')	Tamanho do Produto (pb)	TA (°C)
<i>bcl-2</i>	F: ACG AGT GGG ATG CGG GAG ATG TG R: GCG GTA GCG GCG GGA GAA GTC	245	67
<i>bcl-w</i>	F: AGT TCG AGA CCC GCT TCC R: CCC GTC CCC GTA TAG AGC	308	60
<i>bcl-x_L</i>	F: CTG AAT CGG AGA TGG AGA CC R: TGG GAT GTC AGG TCA CTG AA	211	60
<i>al</i>	F: GGC TGG CTC AGG ACT ATC R: CCA GTT AAT GAT GCC GTC	227	50
<i>mcl-1</i>	F: AGA AAG CTG CAT CGA ACC AT R: CC AGC TCC TAC TCC AGC AAC	183	56
<i>fas</i>	F: CAA GGG ATT GGA ATT GAG GA R: TGG AAG AAA AAT GGG CTT TG	203	55
<i>fas-L</i>	F: AGG AAA GTG GCC CAT TTA AC R: CAA GAT TGA CCC CGG AAG TA	176	55
<i>c-flip</i>	F: GCC GAG GCA AGA TAA GCA R: GCC CAG GGA AGT GAA GGT	464	54
<i>c-iap-1</i>	F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT R: ATG GAC AGT TGG GAA AAT GC	550	59
<i>c-iap-2</i>	F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT R: TGC TTT TGC CAG ATC TGT TG	432	58
<i>faim</i>	F: GGA GCT GCA AAG ACA AAA GC R: ACA AAC TCA CCC GCT GTC TC	233	60
<i>trail</i>	F: AAG GCT CTG GGC CGC AAA ATA AAC R: GCC AAC TAA AAA GGC CCC GAA AAA	411	60
<i>dr4</i>	F: AGAGAGAAGTCCCTGCACCA R: GTCACTCCAGGGCGTACAAT	154	56
<i>dr5</i>	F: AAGACCCTTGTGCGTGTGTGT R: CAGGTGGACACAATCCCTCT	145	57
<i>gapdh</i>	F: GGAGAAGGCTGGGGCTCAT R: GTCCTTCCACGATACCAAAGTT	206	60
<i>β-actina</i>	F: GCC CTG AGG CAC TCT TCC A R: CCA GGG CAG TGA TCT CCT TCT	192	58

Tabela 8. Padronizações das reações de amplificação dos genes propostos no projeto, ciclo padronizado no aparelho de PCR em tempo real, concentração utilizada dos oligonucleotídeos (primer) e a linhagem que foi empregada durante a padronização do ensaio.

Gene	Ciclo	Concentração do primer	Linhagem
<i>bax</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 56°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW SKW-OW
<i>bad</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 60°C - 1 min.	6,0 pM	SKW SKW-OW
<i>bak</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 60°C - 1 min.	8,0 pM	SKW SKW-OW
<i>bid</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 63°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW
<i>bik</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 60°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	LAMA84 KBM5
<i>bok</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 59°C - 20 seg; 72°C - 34 seg.	8,0 pM	SKW
<i>bim_{EL}</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 59°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW SKW-OW
<i>nox_a</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 54°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW-OW
<i>bcl-2</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 67°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	LAMA84
<i>bcl-w</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 60°C - 1 min.	8,0 pM	SKW SKW-OW
<i>bcl-x_L</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 60°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW
<i>al</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 50°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW SKW-OW

Continua

Conclusão

Gene	Ciclo	Concentração do primer	Linhagem
<i>mcl-1</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 56°C - 1 min.	10,0 pM	BV173 LAMA84
<i>fas</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 55°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW SKW-OW
<i>fas-L</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 55°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW
<i>c-flip</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 54°C - 34 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	LAMA84 KBM5
<i>c-iap-1</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 59°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	8,0 pM	SKW
<i>c-iap-2</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 58°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM	SKW SKW-OW
<i>faim</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min /50x: 95°C - 15 seg; 60°C-25 seg; 72°C-34seg	10,0 pM	SKW
<i>trail</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min /50x: 95°C - 15 seg; 60°C-25 seg; 72°C-34seg	10,0 pM	SKW
<i>dr4</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min / 50x: 95°C - 15 seg; 56°C-1 minuto	10,0 pM	SKW
<i>dr5</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min / 50x: 95°C - 15 seg; 57°C-1 minuto	10,0 pM	SKW
<i>gapdh</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/ 40x: 95°C - 15 seg; 60°C-1 min	2,5 pM	SKW
<i>β-actina</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/40x: 95°C - 15 seg; 58°C - 1 min.	2,5 pM	SKW

3.2.5. Indução de apoptose celular e detecção por citometria de fluxo

Para testar o perfil de resistência das células dos pacientes à apoptose celular, as células mononucleares dos pacientes e controles foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com HEPES 10 mM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), L-glutamina 200 mM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), penicilina/estreptomicina 100 unidades/ml e 10% soro bovino fetal (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) à 37°C à 5% CO₂, estando as células na concentração de 10⁶ células/poço em placas de 24 poços. Os linfócitos foram ativados com 2 µg de fitohemaglutinina (Sigma[®], St Louis, Missouri, EUA), durante três dias e, a seguir, expostos aos seguintes agentes apoptogênicos: 1 µM e 5 µM de Actinomicina (ACT-D) (Sigma[®], St Louis, Missouri, EUA), 50 µM de Cicloheximida (CHX) (Sigma[®], St Louis, Missouri, EUA), 25 µM de Etoposídeo (VP16) (Bristol-Meyers-Squibb[®], Sermoneta, Latina, Italy), 25 µM de Teniposídeo (VM26) (Bristol-Meyers-Squibb[®], Sermoneta, Latina, Italy), 25 µM de Citarabina (ARA-C) (Pfizer[®], Nerviano, Milão, Italy) e 0,1 µM e 0,5 µM de Estaurosporina (STS) (Sigma-Aldrich[®], St Louis, Missouri, EUA).

Após 12 horas de incubação, as células foram recuperadas dos poços, centrifugadas e submetidas à avaliação da apoptose celular pelos métodos de Anexina-V FITC.

A apoptose foi quantificada por citometria de fluxo avaliando-se a externalização de fosfatidilserina. As células foram marcadas com anexina V acoplada a FITC na presença de iodeto de propídio (PI) e os espectros de emissão de luz pelos fluorocromos foram analisados no citômetro de fluxo (FACSCanto, BD, San Jose, Califórnia, EUA). Foram adquiridos cinco mil eventos e depois foi feita a “gate” apenas na população de linfócitos, considerando-se tamanho e complexidade. Células em fase precoce de apoptose são positivas para anexina V e negativas para PI, indicando a externalização de fosfatidilserina e a integridade das membranas.

Para tanto, as células recuperadas da cultura após exposição aos agentes apoptogênicos foi lavada com 100 µl de tampão de anexina (10mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂), incubadas com 100 µl de Anexina-V FITC diluída 1:500 em tampão de anexina por 20 minutos, foi adicionado tampão de anexina e 40 uL PI (50 ng/mL) e foi realizada a leitura.

3.2.6. Obtenção de proteína de leucócitos dos pacientes com TE e MF e controles

As proteínas dos leucócitos foram obtidas pela lise em tampão de amostra (5% de mercaptoetanol, 4% de SDS, 20% de glicerol e 100mM Tris-CL-pH 6.8) (100 μ L do tampão para cada 1.10^6 leucócitos) e fervura por 5 minutos. Os lisados foram armazenados a -20°C e foram submetidos aos ensaios de avaliação das proteínas reguladoras da apoptose pelos ensaios de *Western-Blot* (WB).

3.2.7. Detecção das proteínas pró-e anti-apoptóticas por *Western Blot*

Esta metodologia visa à detecção das possíveis alterações da expressão das proteínas envolvidas no processo de apoptose celular presentes nas células dos pacientes. As proteínas dos leucócitos dos pacientes e controles foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF (BRUMATTI et al., 2003). As membranas de Western-blot foram bloqueadas em tampão de TBS-Tween (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,01% Tween-20) com 5% de leite desnatado por 16 horas à temperatura ambiente (TA) e subsequentemente incubadas com os anticorpos da tabela 9.

Tabela 9. Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blot*

Anticorpo	Origem	Diluição
anti-BCL2 humano (551109, BD Pharmingen [®])	monoclonal de camundongo	1:1000
anti-BCL-X _L humano (H-62, SC7195) (Santa Cruz Biotechnology [®])	policlonal de coelho	1:200
anti-BID humano (611528, BD Pharmingen [®])	monoclonal de camundongo	1:500
anti-C-FLIP humano (556257, BD Pharmingen [®])	policlonal de coelho	1:1000
anti-C-IAP-1 humano (556533, BD Pharmingen [®])	monoclonal de camundongo	1:250
anti-MCL-1 humano (K-20, SC958, Santa Cruz Biotechnology [®])	policlonal de coelho	1:300
anti-TRAIL humano (556468, BD Pharmingen [®])	monoclonal de camundongo	1:500

BD Pharmingen[®], San Diego, Califórnia, EUA; Santa Cruz Biotechnology[®], Santa Cruz, Califórnia, EUA.

Para as proteínas endógenas, foram utilizados os anticorpos anti-actina (ACT), monoclonal de camundongo (A3853, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) e anti- γ -tubulina (T3320, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA), policlonal de coelho, ambos na diluição 1:2000. Os anticorpos foram diluídos, nas concentrações indicadas em solução de bloqueio 0,01% azida por um período que variou de 16h à 72h, em temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos para anticorpos de coelho e cabra e 2 lavagens de 10 minutos para anticorpos de camundongo, os *blots* foram incubados com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por uma hora a TA - anti-camundongo IgG (NA931) e anti-coelho (NA934) (Amersham ECL, Horseradish Peroxidase-Linked Species-specific Whole Antibody). A detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência (Amersham ECL Plus®, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) e a intensidade das bandas reconhecidas quantificadas por densitometria pelo programa ImageQuant TL (Image Analysis Software, versão 2005, Amersham Bioscience, Piscataway, USA). Os resultados foram expressos pela razão entre o valor das intensidades das bandas (IDV) das proteínas investigadas e a intensidade da banda da proteína actina da mesma amostra, dos controles e pacientes.

3.2.8. Detecção da percentagem de células mononucleares marcadas para FAS e FAS-L por citometria de fluxo

A análise da expressão das proteínas FAS e FAS-L foi realizada em células mononucleares de 8 controles, 18 pacientes com TE e 4 pacientes com MF. As células ressuspensas em PBS foram incubadas por 20 minutos a 4°C, com 5 uL dos seguintes anticorpos: anti-CD95 (anti-Fas) PE (BD Pharmingen™, San Diego, Califórnia, EUA) e anti-CD95L (Fas-L) PE (MBL, CalTag, Little Balmer, Buckingham, UK). Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS e as células foram ressuspensas em 100ul de PBS. Foram adquiridos 10000 eventos no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA) e as análises foram feitas utilizando-se o software Cellquest. Os resultados foram expressos em percentagem de células positivas para anti-CD95 ou anti-CD95L.

3.2.9. Detecção da Expressão de microRNAs por PCR em tempo real

Para a detecção da expressão de microRNA, a transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando-se 2,5 ng de RNA, 3,8U de inibidor de RNase e os reagentes contidos no

kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), conforme especificações do fabricante. O *random primer*[®] (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) foi substituído pelos *looped-primers*[®] que são específicos para cada microRNA maduro. A reação foi incubada a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Posteriormente, a PCR em Tempo Real foi empregada para quantificação dos microRNAs utilizando-se o kit TaqMan[®] microRNA assays Human (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). A mistura de reação foi preparada utilizando-se: 5 µL de reagente TaqMan[®] (10x); 0,5 µL de sonda (20x) (específica para cada microRNA maduro e marcada com o fluorocromo FAM[®]); 0,5 µL de água reagente estéril Tipo I; 4 µL do cDNA (obtenção explicada no item anterior) diluído 1 para 4 (v/v). A reação foi submetida a um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/60°C por um minuto. A cada ciclo de reação, a *sonda* é degradada devido à atividade 5'→3' exonuclease da enzima Taq o que permite a emissão de fluorescência pelo fluorocromo FAM[®] (comprimento de onda de 520 nm) captado pelo filtro A, do aparelho ABI Prism 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). O nível da expressão dos microRNAs maduros foi calculado com base nos Ct (*cycle threshold*) obtidos, utilizando a equação matemática $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold change*).

Os microRNA estudados foram: hsa-miR-26a (ID000405), hsa-miR-130b (ID000456), hsa-let7d (ID002283), hsa-miR-21 (ID000397), hsa-miR-29c (ID000587), hsa-miR-15a (ID000389), hsa-miR-16 (ID000391) e hsa-miR-198 (ID002273) e os controles endógenos hsa-RNU24 (ID001001) e hsa-RNU-48 (ID001006). Os microRNA estudados foram escolhidos por estudo de bioinformática de acordo com genes relacionados à apoptose estudos e utilizando-se as ferramentas disponíveis nos seguintes sites: <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>; Microcosm Targets (http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/hit_list.pl?genome_id=2964;mirna_id=hsa-miR-16;order_by=external_name;page=3); <http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan>. Os genes alvos relacionados à apoptose preditos por bioinformática e pelas ferramentas disponíveis nos sítios acima estão descritos na tabela 10.

Tabela 10. MicroRNAs e genes alvos.

MicroRNAs	Alvos
let-7d	<i>fas, fas-L, bcl-x, bax, a1, fas</i>
miR26a	<i>bak, mcl-1, c-flip, ciap-2 (birc3)</i>
miR130b	<i>ciap-2 (birc3), c-flip</i>
miR21	<i>bcl-2, ciap-2 (birc3), fas-L</i>
miR29c	<i>bak, bcl-w, mcl-1, ciap-1 (birc2)</i>
miR15a	<i>bcl-2, bik, bcl-w (bcl2L2), BCL2L10 (BIM)</i>
miR16	<i>bcl-2, bcl-w (bcl2L2), bcl2L1 (bcl-x_L), BCL2L11 (BIM), bid, bik, bak1</i>
miR198	<i>bcl-x (BCL2L1), bax</i>

3.2.10. Análises Estatísticas

Para comparação da expressão dos genes e proteínas pró- e anti-apoptóticos, gene *prv1* entre pacientes e controles, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Para as análises de correlação entre expressão gênica e parâmetros do hemograma; e expressão gênica e percentagem de alelos mutados positivos para JAK2 foi aplicada a Correlação de Spearman. O software utilizado para as análises foi o Prisma versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). As diferenças de expressão foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção das células CD34⁺ de indivíduos saudáveis e pacientes e determinação da pureza por citometria de fluxo

A pureza das células CD34⁺ obtidas da medula óssea de pacientes com Mielofibrose Primária e Trombocitemia Essencial foi em média 86,4% (mediana: 90,2; faixa: 49,5% a 98,7%). O número de células CD34⁺ e a pureza obtidos do grupo controle e dos pacientes com MF e TE estão listados na tabela 11 e 12.

Tabela 11. Número e pureza das células CD34⁺, dos controles pós-separação por coluna imunomagnética.

Amostras	Nº CD34 ⁺	Pureza (%)
MOC1	1,3 x 10 ⁵	80,70
MOC2	2,0 x 10 ⁶	80,22
MOC3	7,5 x 10 ⁵	97,46
MOC4	2,0 x 10 ⁶	95,79
MOC5	6,0 x 10 ⁵	87,43
MOC6	3,5 x 10 ⁵	91,05
MOC7	5,0 x 10 ⁴	88,19
MOC8	6,0 x 10 ⁵	> 90
MOC9	6,0 x 10 ⁵	> 90
MOC10	3,1 x 10 ⁵	> 90
MOC11	3,0 x 10 ⁵	> 90
MOC12	6,0 x 10 ⁵	> 90
MOC13	6,0 x 10 ⁵	> 90
MOC14	2,5 x 10 ⁵	> 90
MOC15	6,0 x 10 ⁵	> 90
MOC16	3,9 x 10 ⁵	> 90
MOC17	4,0 x 10 ⁵	> 90
MOC18	3,9 x 10 ⁵	> 90
MOC19	3,0 x 10 ⁵	> 90
MOC20	5,5 x 10 ⁵	87,3
MOC21	1,9 x 10 ⁶	92,0
MOC22	2,0 x 10 ⁶	80,3
MOC23	8,0 x 10 ⁵	92,7

Tabela 12. Número e pureza das células CD34⁺ da medula óssea dos pacientes (MOP) com Mielofibrose Primária (MF) e Trombocitemia Essencial (TE), obtidas por separação em coluna imunomagnética.

Amostra	Nº CD34⁺ (células/mL)	Pureza (%)
MOP MF1	5,0 x 10 ⁵	92,7
MOP MF2	1,2 x 10 ⁶	66,0
MOP MF3	2,5 x 10 ⁵	96,0
MOP MF4*	1,0 x 10 ⁵	ND*
MOP MF5	1,6 x 10 ⁵	85,4
MOP MF6	6,5 x 10 ⁵	96,6
MOP MF7	2,0 x 10 ⁶	98,5
MOP MF8	2,6 x 10 ⁵	93,5
MOP MF9	2,6 x 10 ⁵	78,4
MOP MF10	2,7 x 10 ⁵	89,2
MOP MF11	2,0 x 10 ⁵	ND*
MOP MF12	1,9 x 10 ⁵	ND*
MOP TE1	1,5 x 10 ⁵	52,08
MOP TE2	7,0 x 10 ⁵	98,29
MOP TE3	2,0 x 10 ⁵	94,73
MOP TE4	6,75 x 10 ⁵	90,20
MOP TE5	2,25 x 10 ⁵	92,50
MOP TE6	2,0 x 10 ⁵	98,70
MOP TE7	4,0 x 10 ⁴	83,62
MOP TE8	2,5 x 10 ⁴	ND*
MOP TE9	6,0 x 10 ⁵	91,94
MOP TE10	2,25 x 10 ⁵	96,80

Continua

Conclusão

Amostra	Nº CD34⁺ (células/mL)	Pureza (%)
MOP TE11	3,5 x 10 ⁵	92,34
MOP TE12	4,3 x 10 ⁶	92,27
MOP TE13	5,0 x 10 ⁴	ND
MOP TE14	8,0 x 10 ⁵	58,30
MOP TE15	9,6 x 10 ⁵	49,50
MOP TE16	3,0 x 10 ⁵	93,92
MOP TE17	2,6 x 10 ⁵	78,81
MOP TE18	4,0 x 10 ⁵	80,69
MOP TE19	2,75 x 10 ⁴	ND*
MOP TE20	1,0 x 10 ⁶	90,13
MOP TE21	2,55 x 10 ⁶	88,67
MOP TE22	2,98 x 10 ⁶	83,60
MOP TE23	8,0 x 10 ⁵	90,66
MOP TE24	2,5 x 10 ⁵	85,0
MOP TE25	1,60 x 10 ⁵	92,0
MOP TE26	3,20 x 10 ⁵	89,0

MOP: medula óssea do paciente; ND: Não determinada

* não determinada devido ao pequeno número de células CD34⁺ obtidas.

4.2. Detecção da mutação JAK2V617F no sangue periférico e parâmetros hematológicos dos pacientes

A mutação JAK2V617F foi identificada em cinco dos doze pacientes (41,6%) com MF e em 15 dos 26 pacientes (57,6%) com TE. A porcentagem de alelos mutados detectada nos pacientes está descrita na tabela 13. Os valores de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos, contagem de plaquetas e aumento do tamanho do baço (em centímetros, determinado por ultrassonografia) para esses pacientes estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Porcentagem de alelos mutados JAK2 V617F, parâmetros hematológicos e tamanho do baço dos pacientes com Mielofibrose Primária e Trombocitemia Essencial.

	JAK2V617F (%)	Hb (g/dl)	Ht (%)	Leucócitos (10 ⁹ /L)	Plaquetas (10 ⁹ /L)	Baço
MF01	87	15,9	52,9	14,2	77	Aumentado (18 cm)
MF02	0	9,75	29,5	7,96	61,2	Aumentado (16)
MF03	0	9,88	31,8	2,32	114	Aumentado (5)
MF04	0	5,88	19,2	2,38	38,5	Aumentado (14)
MF05	0	10,3	32,3	4,24	252	Aumentado (11 cm)
MF06	0	15,5	48,5	5,77	339	Aumentado (5 cm)
MF07	0	11,9	37,4	24	117	*
MF08	36	13,1	39,9	5,32	280	Aumentado (4 cm)
MF09	37	8,62	26,3	2,18	71,7	Aumentado (12,5 cm)
MF10	37	12,6	38,3	6,48	345	Normal
MF11	0	9,79	32,0	7160	389	Aumentado (7,6 cm)
MF12	43,6	12,4	37,7	4520	279	Aumentado (5,8cm)

Continua

Continuação

	JAK2V617F (%)	Hb (g/dl)	Ht (%)	Leucócitos (10 ⁹ /L)	Plaquetas (10 ⁹ /L)	Baço
TE1	14	10	30	2,90	428	Normal
TE2	7	16	51,8	11,10	490	Aumentado (3 cm)
TE3	0	14,8	36,3	5,00	752	Aumentado (5 cm)
TE4	30	16,2	39,4	5,60	425	Aumentado (4 cm)
TE5	0	20,8	51,7	4,60	309	Normal
TE6	0	13,1	51,7	3,40	645	Aumentado (3 cm)
TE7	0	14,2	43,9	4,01	927	Aumentado (2 cm)
TE8	0	11,1	34,4	6,54	488	Normal
TE9	33	12,2	39,5	5,90	513	Aumentado (1 cm)
TE10	0	14,9	43,3	32,00	371	Aumentado (1 cm)
TE11	0	13,5	39,5	6,70	425	Normal
TE12	18	12,1	38,8	8,20	688	Aumentado (2 cm)
TE13	63	15,1	44,9	9,08	438	Aumentado (2 cm)
TE14	30	14,8	45,3	4,09	274	Normal
TE15	30	13,2	42,8	6,99	355	Normal
TE16	45	13,6	41,6	5,26	505	Normal
TE17	35	12,8	41,8	13,40	1484	Normal
TE17	35	12,8	41,8	13,40	1484	Normal
TE18	72	14,8	45,7	14,10	1261	Normal
TE19	27	14	41,4	6,5	544	Normal

Continua

Conclusão

	JAK2V617F (%)	Hb (g/dl)	Ht (%)	Leucócitos (10 ⁹ /L)	Plaquetas (10 ⁹ /L)	Baço
TE20	0	11,7	36,7	7,42	636	Aumentado (3 cm)
TE21	29,4	15,5	46,9	12,00	817	Aumentado (2 cm)
TE22	0	13,7	42,9	7,57	556	Normal
TE23	30,2	13	39,9	7,85	483	Normal
TE24	7,7	15,6	48,9	8,90	529	Normal
TE25	0	13,5	41,1	6,69	775	Normal
TE26	0	12	38	9,00	1062	Normal

Porcentagem de JAK2V617F igual à zero: ausência de mutação; Hb: hemoglobina, Ht: hematócrito;

* Paciente esplenectomizado.

4.3. Detecção da expressão gênica por real time PCR em células CD34⁺

4.3.1. Quantificação da expressão dos genes endógenos em células CD34⁺

Os valores de Ct (*Cycle Threshold*) dos genes endógenos (*beta-actina* e *gapdh*) das CD34⁺ de amostras de medula óssea de indivíduos pertencentes ao grupo controle (controles, MOC) e das células CD34⁺ dos pacientes (MF e TE) estão mostrados nas tabelas 14 e 15. Foi utilizada a média geométrica dos genes endógenos *gapdh* e *beta-actina* para o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (“*fold change*”).

Tabela 14. Valores de Ct dos “housekeeping genes” β -actina e gapdh em células CD34⁺ dos controles.

Amostras	Ct (β -actina)	Ct (gapdh)
MOC01	19,10	30,00
MOC02	19,69	29,75
MOC03	18,91	27,04
MOC04	18,52	27,93
MOC05	19,40	30,23
MOC06	26,61	29,36
MOC07	19,92	34,91
MOC08	18,50	29,82
MOC09	18,77	30,65
MOC10	16,85	31,9
MOC11	19,91	32,36
MOC12	20,23	30,59
MOC13	23,77	32,15
MOC14	17,96	29,44
MOC15	17,67	31,34
MOC16	17,46	30,55
MOC17	15,66	30,58
MOC18	17,43	32,62
MOC19	17,97	30,88
MOC20	19,64	21,82
MOC21	17,50	21,7
MOC22	19,17	22,07
MOC23	17,78	21,29

MOC: medula óssea controle; Ct: *Cycle Threshold*.

Tabela 15. - Valores de Ct dos “housekeeping genes β -actina e gapdh” em células CD34⁺ da medula óssea dos pacientes com Mielofibrose Primária (MF) e Trombocitemia Essencial (TE).

Amostras	Ct (<i>beta-actina</i>)	Ct (<i>gapdh</i>)
MOP MF1	26,66	30,12
MOP MF2	20,50	28,13
MOP MF3	18,68	30,57
MOP MF4 *	32,6	29,50
MOP MF5	20,32	29,85
MOP MF6	18,36	31,96
MOP MF7	17,20	19,99
MOP MF8	17,29	21,85
MOP MF9	16,19	20,44
MOP MF10	16,17	20,55
MOP MF11	18,40	21,71
MOP MF12	18,36	22,07
MOP TE1	23,02	35,52
MOP TE2	18,71	25,72
MOP TE3	29,23	31,64
MOP TE4	20,54	30,91
MOP TE5	21,59	30,97
MOP TE6	27,50	30,23
MOP TE7	31,56	29,1
MOP TE8	22,45	27,49
MOP TE9	22,39	30,52
MOP TE10	26,17	36,65
MOP TE11	24,05	35,52
MOP TE12	22,46	27,49
MOP TE13	33,58	30,23
MOP TE14	27,70	31,20
MOP TE15	22,34	30,58

Continua

Conclusão

Amostras	Ct (<i>beta-actina</i>)	Ct (<i>gapdh</i>)
MOP TE16	21,99	34,20
MOP TE17	25,59	35,21
MOP TE18	28,51	36,51
MOP TE19	22,93	44,6
MOP TE20	19,06	23,23
MOP TE21	18,6	21,92
MOP TE22	17,24	20,21
MOP TE23	18,27	20,72
MOP TE24	18,95	21,46
MOP TE25	19,55	21,66
MOP TE26	22,04	23,05

MOP: Medula óssea de paciente; Ct: *Cycle Threshold*.

4.3.2. Quantificação da expressão dos genes da família Bcl-2 em células CD34⁺

A quantificação da expressão dos genes anti-apoptóticos da família Bcl-2: *a1*, *mcl-1*, *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-x_L* em células CD34⁺ foi determinada por PCR em tempo real e expressa pelo $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados obtidos foram comparados entre os grupos controle e de paciente com TE e MF. O mesmo procedimento de análise foi aplicado para a expressão dos genes pró-apoptóticos *bax*, *bad*, *bak*, *bid*, *bik*, *bim_{EL}*, *bok* e *nox_a*. A mediana dos resultados de cada grupo e o nível de significância para as diferenças detectadas estão apresentados nas tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referentes à expressão dos genes *a1*, *mcl-1*, *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-x_L* em células CD34⁺ dos grupos MOC, TE e MF.

	<i>a1</i>	<i>mcl-1</i>	<i>bcl-2</i>	<i>bcl-x_L</i>	<i>bcl-w</i>
Controles	0,98	0,43	1,99	1,98	1,01
TE	26,05***	2,07*	0,42	1,37	1,55
MF	21,11***	3,24	0,18**	1,95	39,06*

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

Tabela 17. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referentes à expressão dos genes *bax*, *bad*, *bak*, *bid*, *bik*, *bim_{EL}*, *bok* e *noxa* em células CD34⁺ do grupo controle e de pacientes com TE e MF.

	<i>bad</i>	<i>bak</i>	<i>bax</i>	<i>Bid</i>	<i>bik</i>	<i>bim_{EL}</i>	<i>bok</i>	<i>noxa</i>
Controles	3,62	1,67	5,10	1,15	1,36	0,77	0,70	0,66
TE	1,34	5,12	0,19*	5,70*	2,99*	5,45	29,36***	4,42***
MF	6,05	11,6*	2,82	2,17	2,00	0,68	18,94*	5,97*

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

A análise da expressão gênica em células CD34⁺ de pacientes com TE mostrou que a expressão dos genes anti-apoptóticos *a1* e *mcl-1* e dos genes pró-apoptóticos *bid* e *bik* estava elevada em comparação aos controles (p < 0,0001, p = 0,035, p = 0,013 e p = 0,028, respectivamente). O nível do mRNA do gene pró-apoptótico *bax* estava diminuído nas células CD34⁺ de pacientes com TE em comparação aos controles (p = 0,032) (Figuras 6A-E).

Nas células CD34⁺ isoladas dos pacientes com MF, os genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-w* e o pró-apoptótico *bak* apresentaram níveis significativamente maiores de expressão quando comparados aos controles (p = 0,0002, p = 0,012 e p = 0,046) (Figuras 6A, F e G). O gene anti-apoptótico *bcl-2* estava menos expresso em MF do que nos controles (p = 0,009) (Figura 6H).

Os genes pró-apoptóticos *bok* e *noxa* estavam mais expresso nos paciente nas células CD34⁺ dos pacientes com TE (p = 0,0006, p=0,0009) e MF (p=0,0193, p=0,0125) (Figuras 6I e J).

Figura 6. Expressão diferencial dos genes *a1*, *mcl-1*, *bid*, *bik*, *bax*, *bcl-w*, *bak*, *bok* e *nox* em células CD34⁺ de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

Para os demais genes (*bcl-x_L*, *bad* e *bim_{EL}*) não foi encontrada diferença significativa de expressão em células CD34⁺ de pacientes com TE e MF em comparação aos controles ($p > 0,05$) (Figura 7).

Figura 7. Expressão dos genes *bcl-x_L*, *bad* e *bim_{EL}* em células CD34⁺ de pacientes com TE e MF. Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$). As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

4.3.3. Quantificação da expressão dos genes da família dos inibidores de apoptose *c-iap-1*, *c-iap-2*, *XIAP* e *survivina* em células CD34⁺.

A mediana dos resultados de expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) e o nível de significância (p) dos genes *c-iap-1*, *c-iap-2*, *XIAP* e *Survivina* constam na tabela 18.

Tabela 18. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos referentes à expressão dos genes *c-iap-1*, *c-iap-2*, *XIAP* e *Survivina* em células CD34⁺ do grupo controle e de pacientes com TE e MF.

	<i>c-iap-1</i>	<i>c-iap-2</i>	<i>XIAP</i>	<i>survivina</i>
Controles	0,82	0,72	0,73	1,39
TE	5,46**	9,69**	2,70	0,83
MF	11,58	37,92**	1,52	0,38*

nível de significância ($p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$)

A expressão do gene *c-iap-1* nas células CD34⁺ apresentou diferença significativa entre os grupos controle e TE ($p = 0,0083$) e entre os grupos controle e MF ($p = 0,0149$). O

gene *c-iap-2* estava mais expresso no grupo de pacientes com TE e MF comparado ao grupo controle ($p = 0,0056$; $p = 0,0005$, respectivamente) (Figura 8).

O gene *XIAP* não apresentou diferença significativa de expressão em relação aos controles ($p > 0,05$) e a expressão do gene *survivina* foi menor nos pacientes com MF ($p = 0,0403$).

Figura 8. Expressão dos genes *c-iap-1*, *c-iap-2*, *XIAP* e *survivina* em células CD34⁺ de indivíduos do grupo controle e de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

4.3.4. Quantificação da expressão dos genes relacionados à regulação da via extrínseca da apoptose

A mediana dos resultados de expressão gênica (2^{-ΔΔC_t}) e o nível de significância (p) dos genes que participam da via extrínseca da apoptose *fas*, *fas-L*, *faim*, *c-flip*, *trail*, *dr4* e *dr5*, estão relatados na tabela 19.

Tabela 19. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos referentes à expressão dos genes *fas*, *fas-L*, *faim*, *c-flip*, *trail*, *dr4* e *dr5* em células CD34⁺ do grupo controle e de pacientes com TE e MF.

	<i>fas</i>	<i>fas-L</i>	<i>faim</i>	<i>c-flip</i>	<i>Trail</i>	<i>dr4</i>	<i>dr5</i>
Controles	1,80	1,13	0,82	0,78	0,87	1,54	0,72
TE	5,52**	4,46	26,03***	0,92*	1,48	5,20**	1,14
MF	6,51**	212,9***	17,75**	5,64**	0,88	7,64	0,49

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

Como pode ser visto na figura 9, a expressão de *fas* foi significativamente maior nos grupos de TE e MF quando comparada à expressão no grupo controle (p=0.0013 and p=0.0023, respectivamente) (Figura 9A) e também encontramos diferença significativa entre os grupos controle e MF em termos da expressão de nível de mRNA de *fas-L* em células CD34⁺ (p=0.0008, Figura 9B). A expressão de *dr4* estava elevada no grupo de TE (p=0.0079; Figura 9C).

A expressão do gene *faim* também estava elevada em TE e MF em comparação aos controles (p=0.0002, p=0.0071), como mostrado na figura 9D, assim como a expressão de *c-flip* estava elevada nos grupos de TE e MF (p=0.0121 and p=0.0019, respectivamente; Figura 9E).

Figura 9. Expressão diferencial dos genes *fas*, *fas-L*, *dr4*, *faim* e *c-flip* em células CD34⁺ de indivíduos do grupo controle e de pacientes com TE e MF.

Em contraste, os níveis de expressão de *trail* e *dr5* nas células CD34⁺ foram similares entre pacientes e controles (p > 0.05) (Figura 10).

Figura 10. Expressão dos genes *trail* e *dr5* em células CD34⁺ de pacientes com TE e MF. Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0.05$). As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

Analisando a expressão de *fas-L* entre os grupos, foi detectada uma diferença significativa entre os grupos de pacientes com TE e MF ($p = 0,0063$, figura 9B).

Não houve variação da expressão desses genes relacionados à apoptose ($p > 0.05$) com relação à idade (faixa 14-54 anos, mediana 37,0 anos) dos controles doadores de medula óssea (figura não mostrada).

4.4. Detecção da expressão gênica por real time PCR em leucócitos

4.4.1. Quantificação da expressão dos genes endógenos em leucócitos do sangue periférico

Os Ct obtidos para genes endógenos nos leucócitos do sangue periférico dos indivíduos saudáveis (Sangue Periférico Controle - SPC) estão descritos na tabela 19. Os Ct obtidos para genes endógenos nos leucócitos dos pacientes com MF e TE constam na tabela 20.

Tabela 20. Ct do housekeeping gene β -actina e gapdh médio para leucócitos do sangue periférico do grupo controle.

Amostras	Ct (β -actina)	Ct (gapdh)
SPC1	16,65	18,30
SPC2	15,88	16,93
SPC3	16,29	18,10
SPC4	16,51	16,50
SPC5	16,71	17,10
SPC6	17,26	18,50
SPC7	20,92	21,13
SPC8	20,12	22,60
SPC9	13,17	15,71
SPC10	12,97	14,68
SPC11	13,91	15,97
SPC12	13,28	16,01
SPC13	15,26	21,03
SPC14	16,30	20,27
SPC15	18,05	21,93
SPC16	16,93	21,74
SPC17	17,03	20,53
SPC18	19,36	23,56
SPC19	18,07	21,38
SPC20	18,68	23,64
SPC21	17,61	21,05
SPC22	17,38	21,05
SPC23	17,26	20,67
SPC24	16,78	20,31
SPC25	17,69	21,10
SPC26	17,56	20,88
SPC27	17,47	21,17
SPC28	17,24	21,52
SPC29	18,58	21,32

Continua

Conclusão

Amostras	Ct (β -actina)	Ct (gapdh)
SPC30	17,28	21,05
SPC31	18,32	21,51
SPC32	19,03	23,30
SPC33	18,37	22,00
SPC34	18,34	21,65
SPC35	19,07	22,70
SPC36	18,10	20,84
SPC37	14,76	20,41

SPC: Sangue Periférico Controle.

Tabela 21. Valores de Ct dos housekeeping genes β -actina e gapdh para os leucócitos do sangue periférico dos pacientes com Mielofibrose Primária e Trombocitemia Essencial.

Amostras	Ct (β -actina)	Ct (gapdh)
SPP MF1	19,82	21,25
SPP MF2	16,91	19,87
SPP MF3	15,99	18,71
SPP MF4	19,76	23,11
SPP MF5	18,09	22,14
SPP MF6	16,21	19,40
SPP MF7	15,38	18,61
SPP MF8	16,10	21,83
SPP MF9	15,54	21,22
SPP MF10	14,95	20,18
SPP MF11	16,05	19,92
SPP MF12	17,06	19,66
SPP TE1	19,81	19,60
SPP TE2	19,56	20,10
SPP TE3	19,71	18,33
SPP TE4	20,17	21,65
SPP TE5	18,81	19,32
SPP TE6	19,70	19,51
SPP TE7	19,45	23,85
SPP TE8	18,14	23,30
SPP TE9	19,40	18,65
SPP TE10	18,80	21,30

Continua

Conclusão

Amostras	Ct (β-actina)	Ct (gapdh)
SPP TE11	18,70	19,90
SPP TE12	19,75	19,10
SPP TE13	19,75	20,00
SPP TE14	23,14	18,60
SPP TE15	18,37	16,10
SPP TE16	15,36	15,30
SPP TE17	16,48	16,60
SPP TE18	13,38	21,00
SPP TE19	14,53	23,72
SPP TE20	18,10	22,86
SPP TE21	19,13	25,24
SPP TE22	16,70	21,22
SPP TE23	16,45	21,68
SPP TE24	16,83	20,60
SPP TE25	16,44	20,83
SPP TE26	16,54	22,30

SPP: Sangue Periférico de Paciente.

4.4.2. Quantificação da expressão dos genes da família Bcl-2

Os resultados da expressão dos genes anti-apoptóticos da família Bcl-2: *al*, *mcl-1*, *bcl-2*, *bcl-w* e, *bcl-x_L* em leucócitos determinada por PCR em tempo real e expressa $2^{-\Delta\Delta C_t}$, foram comparados entre os grupos controles e de pacientes. O mesmo foi feito para os anti-apoptóticos *bax*, *bad*, *bak*, *bid*, *bik*, *bim_{EL}*, *bok* e *noxa*. A mediana dos resultados de cada grupo e o nível de significância para as diferenças detectada são apresentados nas tabelas 22 e 23.

Tabela 22. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos referentes à expressão dos genes *al*, *mcl-1*, *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-x_L* em leucócitos de sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes com TE e MF.

	<i>al</i>	<i>mcl-1</i>	<i>bcl-2</i>	<i>bcl-x_L</i>	<i>bcl-w</i>
Controle	0,50	0,93	0,89	0,80	1,07
TE	16,13**	1,85	2,21*	2,71**	2,22*
MF	3,75	0,75	9,17*	16,10*	27,86***

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

Tabela 23. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dos genes pró-apoptóticos *bax*, *bad*, *bak*, *bid*, *bik*, *bim_{EL}*, *bok* e *noxa* e o nível de significância (p) referente à comparação da expressão gênica dos leucócitos dos controles e pacientes com TE e MF.

	<i>bad</i>	<i>bak</i>	<i>bax</i>	<i>bid</i>	<i>bik</i>	<i>bim_{EL}</i>	<i>bok</i>	<i>noxa</i>
Controle	0,64	1,03	0,95	1,43	2,05	0,85	0,71	1,29
TE	3,92*	1,56	0,72	0,62***	1,12	0,53*	9,32**	0,81
MF	5,18*	3,73	2,32	0,56	1,98	0,64	510,0***	0,53

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

A análise da expressão gênica em leucócitos de pacientes com TE mostrou um aumento na expressão dos genes anti-apoptóticos *al*, *bcl-2*, *bcl-x_L* e *bcl-w* quando comparada ao grupo controle (p < 0,0001, p = 0,022, p = 0,004 e p = 0,034) (Figuras 11A-D). Os genes pro-apoptóticos *bad*, *bid*, *bim_{EL}* e *bok* apresentaram menor expressão em leucócitos de TE comparada aos controles (p = 0,013, p = 0,0004, p = 0,012 e p = 0,0003) (Figuras 11D-H).

Nos leucócitos de MF, a expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x_L* e *bcl-w* estava elevada em comparação aos controles (p = 0,029, p = 0,0145 and p = 0,0007) (Figuras 11B, C e D), assim como também a expressão do pró-apoptótico *bok* se mostrou aumentada (p = 0,0005) (Figura 11H).

Os genes *mcl-1*, *bak*, *bax*, *bik* e *noxa* não apresentaram diferença significativa na expressão quando os grupos de pacientes e controles foram comparados (p > 0,05) (Figuras 12A-E).

Figura 11. Expressão diferencial dos genes *a1*, *mcl-1*, *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *bad*, *bid*, *bim_{EL}*, e *bok* em leucócitos de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

Figura 12. Expressão diferencial dos genes *mcl-1*, *bak*, *bik* e *noxa* em leucócitos de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

4.4.3. Quantificação da expressão dos genes família dos inibidores de apoptose – *c-iap-1*, *c-iap-2*, *XIAP* e *survivina*

A mediana dos $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos genes anti-apoptóticos *c-iap-1* e *c-iap-2* e o nível de significância (p) referente aos leucócitos dos indivíduos controles, dos pacientes com TE e MF constam na tabela 24.

Tabela 24. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos genes *c-iap-1* e *c-iap-2* e o nível de significância (p) referente à comparação dos valores da expressão gênica dos leucócitos do sangue periférico dos indivíduos do grupo controle e pacientes com TE e MF.

	<i>c-iap-1</i>	<i>c-iap-2</i>	<i>XIAP</i>	<i>Survivina</i>
Controles	1,66	0,66	1,71	1,00
TE	0,22	3,43**	0,57**	0,32***
MF	11,33	28,10**	0,26***	1,30

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

O gene *c-iap-1* está menos expresso nos pacientes TE em relação ao grupo controle (p = 0,0479), enquanto o gene *c-iap-2* estava mais expresso nos pacientes com TE e MF com relação ao grupo controle (p = 0,0065; p = 0,0003) e diferencialmente expresso entre os grupos TE e MF (p = 0,0170) (Figura 13). O gene *XIAP* apresentou diferença de expressão nos grupos TE e MF quando comparados aos controles (p = 0,0065; p = 0,0003), assim como a expressão do gene *survivina* foi significativamente diferente nos pacientes com TE comparado ao grupo controle (p = 0,0002) (Figura 13).

Figura 13. Expressão dos genes *c-iap-1*, *c-iap-2*, *XIAP* e *survivina* em leucócitos de sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

4.4.4. Quantificação da expressão dos genes relacionados à via extrínseca da apoptose

A mediana dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dos genes que participam da via extrínseca da apoptose *fas*, *fas-L*, *faim*, *c-flip*, *trail*, *dr4* e *dr5* e o nível de significância (p) referente comparação entre os dados de expressão gênica dos leucócitos dos controles e dos pacientes com TE e MF constam na tabela 25.

Tabela 25. Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos para os genes *fas*, *fas-L*, *faim*, *c-flip*, *trail*, *dr4* e *dr5* em leucócitos do sangue periférico de pacientes e controles.

	<i>fas</i>	<i>fas-L</i>	<i>faim</i>	<i>c-flip</i>	<i>trail</i>	<i>dr4</i>	<i>dr5</i>
Controles	0,74	2,61	1,19	0,94	1,61	0,78	0,85
TE	0,60	0,86*	1,15	1,15	0,39*	1,90*	1,26
MF	1,27	0,60*	1,52	2,98	0,54*	2,19	1,70

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

A expressão do gene *trail* e *fas-L* foi menor em leucócitos de TE e MF (*trail*: p = 0,0012, p = 0,0416; *fas-L*: p = 0,0197, p = 0,0459) e a expressão do seu receptor *dr4* foi maior em TE (p = 0,0283, Figura 14A-C). A expressão dos genes *fas*, *faim*, *c-flip* e *dr5* não foi diferente entre os grupos de TE e MF e controle (p > 0.05) (Figura 15A-D).

Figura 14. Expressão dos genes *trail*, *fas-L* e *dr4* em leucócitos de sangue periférico do grupo controle e de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

Figura 15. Expressão dos genes *fas*, *faim*, *c-flip* e *dr5* em leucócitos de sangue periférico do grupo controle e de pacientes com TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

4.5. Determinação da expressão do gene *PRV-1* em células CD34⁺ e leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial e Mielofibrose

As medianas dos 2^{-ΔΔCt} da expressão do gene *PRV-1* em células CD34⁺ e dos leucócitos dos grupos controle e pacientes com TE e MF, bem como o nível de significância (p) referente às comparações das expressões gênicas desses grupos constam na tabela 26.

Tabela 26. Valores das medianas dos 2^{-ΔΔCt} obtidos para o gene *PRV-1* em pacientes e controles.

	CD34 ⁺	Leucócitos
Controles	4,067(n=9)	0,93
TE	2,052 (n=22)	3,04**
MF	1,328(n=10)	5,12***

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

Com relação à expressão de *PRV-1* nas células $CD34^+$, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Figura 16A). Foi encontrada diferença significativa na expressão do gene *PRV-1* nos leucócitos dos pacientes com TE e MF comparados ao grupo controle ($p = 0,0015$; $p = 0,0009$) (Figura 16B).

Figura 16. Expressão do gene *PRV-1* em células $CD34^+$ e em leucócitos dos grupos controle, TE e MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

4.6. Correlação da expressão do gene *PRV-1* e genes relacionados à apoptose em leucócitos de pacientes com TE e MF

Foi encontrada correlação positiva entre a expressão do gene *PRV-1* e os genes anti-apoptóticos *c-iap-2* ($r = 0,4222$; $p = 0,0158$) e *al* ($r = 0,3409$; $p = 0,0442$) em leucócitos de pacientes com TE (Figura 17A e B). Para os genes pró-apoptóticos *bax*, *bik* e *trail* a correlação foi negativa (*bax*: $r = -0,3791$; $p = 0,0281$; *bik*: $r = -0,5009$; $p = 0,0046$; *trail*: $r = -0,4202$; $p = 0,0163$) (Figura 17 C-E). Em leucócitos de pacientes com MF, foi encontrada correlação positiva entre a expressão de *PRV-1* e o gene anti-apoptótico *bcl-w* ($r = 0,6503$; $p = 0,0110$) em leucócitos de pacientes com MF (Figura 17F).

Figura 17. Correlação entre a expressão do gene *PRV-1* e de genes relacionados à apoptose em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial e Mielofibrose.

4.7. Correlação da expressão de genes anti e pro-apoptóticos com a mutação JAK2V617F

Considerando os resultados obtidos para expressão gênica e os dados relativos à mutação JAK2V617F foram feitos dois tipos de comparações: a primeira entre os pacientes com presença ou ausência da mutação JAK2V617F e, a segunda, com a porcentagem de alelos mutados. Os genes da via intrínseca da apoptose que se apresentaram diferencialmente expressos entre pacientes JAK2V617F positivos e negativos estão mostrados na Figura 18.

Figura 18. Expressão diferencial entre JAK2V617F positivos e negativos dos genes *a1*, *mcl-1* e *bid* em células CD34⁺ de pacientes com MF; dos genes *bik* e *nox4* em células CD34⁺ de pacientes com TE e dos genes *bad* e *bax* em leucócitos de pacientes com TE. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

A figura 19 apresenta os resultados de expressão diferencial do gene *c-iap-2* em pacientes com MF JAK2V617F positivos e negativos, e também os resultados para os genes da via extrínseca (*faim*, *fas* e *dr4*).

Figura 19. Expressão diferencial entre JAK2V617F positivos e negativos do gene *c-iap-2*, *faim*, *fas* e *dr4* em células CD34⁺ e leucócitos de pacientes com MF. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo.

Além da expressão diferencial desses genes entre pacientes JAK2V617F positivos e negativos, foi detectada a correlação entre a expressão dos genes e a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F para os genes apresentados nas Figuras 20 e 21.

Figura 20. Correlação entre a expressão dos genes *a1*, *mcl-1*, *bid*, *nox*, *bad* e *bax* e a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F.

Figura 21. Correlação entre a expressão dos genes *c-iap-2*, *faim* e *fas* e a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F.

4.8. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F e os parâmetros hematológicos dos pacientes

Houve correlação positiva entre a porcentagem de alelos mutados (JAK2V617F) e a contagem de leucócitos em pacientes com TE ($r = 0,4115$; $p = 0,0133$) (Figura 22).

Figura 22. Correlação entre a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F e a contagem de leucócitos dos pacientes com TE.

4.9. Correlação da expressão gênica com parâmetros hematológicos dos pacientes e esplenomegalia

4.9.1. Correlação da expressão gênica com parâmetros hematológicos

Nos pacientes com MF foi encontrada correlação entre a expressão dos genes *bad* e *bak* em leucócitos e os valores de hemoglobina e do hematócrito (Figura 23).

Figura 23. Correlação entre a expressão dos genes *bad* e *bak* e a concentração de hemoglobina (Hb) e o Hematócrito (Ht) em pacientes com Mielofibrose Primária.

Quando foi analisada a correlação da expressão gênica com o número de leucócitos do hemograma do dia da coleta, foi encontrada correlação negativa entre a expressão do gene anti-apoptótico *mcl-1* e dos pró-apoptóticos *nox* e *bad* (Figura 24A-C). Além disso, foi observada a correlação negativa entre a contagem de leucócitos e a expressão de *c-flip* em pacientes com TE (Figura 24D).

Figura 24. Correlação entre a expressão dos genes anti-apoptóticos *mcl-1*, *nox*a, *bad* e *c-flip* e a contagem de leucócitos dos pacientes com TE.

A expressão do gene anti-apoptótico *c-iap-2* em células $CD34^+$ de pacientes com TE apresentou correlação negativa com a contagem de leucócitos, como mostrado na figura 25A, enquanto que a expressão do gene *faim* apresentou correlação positiva com a contagem de leucócitos de pacientes com TE (Figura 25B).

Figura 25. Correlação entre a expressão dos genes *c-iap-2* e *faim* em células $CD34^+$ de pacientes com TE e a contagem de leucócitos desses pacientes.

Também foi calculada a correlação entre a expressão dos genes e a contagem de plaquetas do hemograma dos pacientes realizados no dia da coleta da amostra biológica. Os genes anti-apoptóticos *a1*, *mcl-1*, *bcl-w*, *bcl-x_L* e *c-flip* (Figura 26), os anti-apoptóticos *c-iap-2*, *survivina* e *XIAP* (Figura 27) e os gene pró-apoptóticos *bak*, *bid*, *bim_{EL}* e *bok* apresentaram correlação com o número de plaquetas (Figura 28).

Figura 26. Correlação entre a expressão dos genes anti-apoptóticos *a1*, *mcl-1*, *bcl-w*, *bcl-x_L* e *c-flip* e a contagem de plaquetas.

Figura 27. Correlação entre a expressão dos genes anti-apoptóticos *c-iap-2*, *survivina* e *XIAP* e a contagem de plaquetas

Figura 28. Correlação entre a expressão dos genes pró-apoptóticos *bak*, *bid*, *bim_{EL}* e *bok* e a contagem de plaquetas.

4.9.2. Correlação da expressão gênica com esplenomegalia

Foi encontrada correlação positiva entre a expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x_L*, *c-iap-2*, *XIAP*, *survivina*, *faim* e o aumento do baço determinado por ultrassonografia dos pacientes (esplenomegalia) (Figura 29). Para os genes pró-apoptóticos *bax* e *bik*, foi encontrada correlação negativa com o aumento do baço (Figura 30). Já os pró-apoptóticos *bax*, *bik*, *bok* e *nox*a apresentaram correlação positiva (Figura 31) assim como os genes da via extrínseca *fas*, *fas-L*, *trail*, *dr5* e *c-flip* (Figura 32).

Figura 29. Correlação entre a expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x_L*, *c-iap-2*, *XIAP*, *survivina* e *faim* e esplenomegalia (aumento do baço em centímetros) nos pacientes com TE.

Figura 30. Correlação entre a expressão dos genes pró-apoptóticos *bax* e *bik* e esplenomegalia (aumento do baço em centímetros) nos pacientes com TE.

Figura 31. Correlação entre a expressão dos genes pró-apoptóticos *bim_{EL}*, *bik*, *bok* e *noxa* e esplenomegalia (aumento do baço em centímetros) nos pacientes com TE.

Figura 32. Correlação entre a expressão dos genes da via extrínseca e esplenomegalia (aumento do baço em centímetros) nos pacientes com TE.

4.10. Correlações da expressão do gene *PRV-1* com a mutação JAK2V617F, parâmetros hematológicos e esplenomegalia

4.10.1. Comparação da expressão do gene *PRV-1* em pacientes positivos e negativos para a mutação JAK2V617F e correlação com a porcentagem de alelos mutados

Foi encontrada diferença significativa na expressão do gene *PRV-1* em leucócitos de pacientes JAK2V617F positivos (mediana: 4,88) e negativos (1,91). Coerentemente, foi encontrada correlação da expressão com a porcentagem de alelos mutados (Figura 33). Além disso, a expressão do gene *PRV-1* em leucócitos de pacientes de MF, também apresentou correlação com a porcentagem de alelos mutados. (Figura 33).

Figura 33. Comparação da expressão do gene *PRV-1* nos leucócitos de pacientes positivos e negativos para a mutação JAK2V617F e correlação com a porcentagem de alelos mutados.

4.10.2. Correlação da expressão do gene *PRV-1* com parâmetros hematológicos dos pacientes e esplenomegalia

Foi encontrada correlação positiva entre a expressão do gene *PRV-1* em células CD34⁺ de pacientes com MF e a contagem de leucócitos desses pacientes (Figura 34).

Figura 34. Correlação da expressão do gene *PRV-1* e a contagem de leucócitos em pacientes com Mielofibrose.

Uma correlação negativa foi detectada entre a expressão do gene *PRV-1* em leucócitos dos pacientes com TE e MF e a número de plaquetas (Figura 35). Também foi observada correlação da expressão de *PRV-1* com o aumento do baço em pacientes com MF.

Figura 35. Correlação da expressão do gene *PRV-1* e a contagem de plaquetas e esplenomegalia em pacientes com Trombocitemia Essencial e Mielofibrose.

4.11. Ensaio de indução de apoptose de linfócitos

A mediana da porcentagem de apoptose dos linfócitos do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes com TE e MF obtidas pela ação de agentes apoptogênicos estão descritas na tabela 27.

Tabela 27. Medianas das porcentagens de apoptose dos linfócitos dos grupos controle e de pacientes com TE e MF.

	ACT	ACT	CHX	VP16	ARA-C	STS	STS	VM26
	1 uM	5 uM	50 uM	25 uM	25 uM	0,1 uM	0,5 uM	25 uM
Controle	27,60	34,75	15,90	16,90	9,10	7,10	29,00	18,70
TE	13,00	20,60	10,90	15,60	6,15	9,45	15,25	17,90
MF	4,20	5,20	1,32	2,80	1,85	1,20	5,25	6,65

ACT: actinomicina; CHX: cicloheximida; VP16: etoposídeo; ARA-C: citarabina; STS: estaurosporina; VM26: teniposídeo.

A porcentagem de apoptose das células de pacientes e controles foi diferente e, estatisticamente significativa para todos os indutores de apoptose utilizados. Os linfócitos dos pacientes com Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária foram mais resistentes à apoptose do que linfócitos do grupo controle (Figura 36).

Figura 36. Porcentagem de apoptose (positividade para Anexina-V FITC) induzida por (A) ACT 1 uM e (B) ACT 5 uM, (C) CHX 50 uM, (D) VP16 25 uM, (E) ARA-C 25 uM, (F) STS 0,1 e 0,5 uM e (G) VM26 25 uM em linfócitos de indivíduos dos grupos controle, TE e MF, determinada por citometria de fluxo.

4.12. Correlação entre expressão gênica e a porcentagem de linfócitos em apoptose induzida por drogas

4.12.1. Correlação entre expressão gênica e apoptose detectada pela marcação com Anexina-V FITC

As análises de correlação entre expressão gênica nas células CD34⁺ de pacientes com TE e porcentagem de apoptose mostraram correlação positiva entre a expressão dos pró-apoptótico *bik* e a apoptose induzida por citarabina 25 uM (ARA-C) e estaurosporina (STS) 0,1 uM, assim como o gene *nox* e *trail* com a apoptose induzida por STS 0,1 uM (Figura 37A-D). A expressão do anti-apoptótico *faim* e a apoptose induzida por etoposídeo (VP16) 25 uM se correlacionaram negativamente (Figura 37E).

Figura 37. Correlação entre expressão dos genes *bik*, *nox*, *trail* e *faim* em células CD34⁺ e a porcentagem de apoptose induzida por citarabina (ARA-C), estaurosporina (STS) e etoposídeo (VP-16).

A expressão dos genes anti-apoptóticos *a1* e *mcl-1* em leucócitos de pacientes com TE apresentaram correlação negativa com a porcentagem de apoptose induzida por actinomicina (ACT) e estaurosporina (STS) (Figura 38A-C).

Figura 38. Correlação entre expressão dos genes *a1* e *mcl-1* em leucócitos e a porcentagem de apoptose induzida por actinomicina (ACT) e estaurosporina (STS).

A expressão dos genes pró-apoptóticos *bad*, *bid*, *bik* e *bim_{EL}* em leucócitos de TE apresentou correlação positiva com a porcentagem de apoptose induzida por estaurosporina (STS), actinomicina (ACT) e teniposídeo (VM26) (Figura 39).

Figura 39. Correlação positiva entre expressão dos genes pró-apoptóticos *bad*, *bid*, *bik* e *bim_{EL}* em leucócitos e a porcentagem de apoptose induzida por actinomicina (ACT) e estaurosporina (STS).

A expressão dos genes *fas-L* e *dr4* em leucócitos apresentou correlação positiva com a porcentagem de apoptose induzida por citarabina (ARA-C), actinomicina (ACT) e tenipósídeo (VP16) (Figura 40).

Figura 40. Correlação positiva entre expressão dos genes *fas-L* e *dr4* em leucócitos e a porcentagem de apoptose induzida por citarabina (ARA-C), actinomicina (ACT) e etopósídeo (VP16).

O gene anti-apoptótico da família dos IAPs *survivina* se correlacionou negativamente com a porcentagem de apoptose induzida por actinomicina (ACT) (Figura 41).

Figura 41. Correlação positiva entre expressão do gene *survivina* em leucócitos e a porcentagem de apoptose induzida por actinomicina (ACT).

4.12.2. Correlação entre a expressão do gene *PRV-1* e a porcentagem de apoptose

O nível de expressão do gene *PRV-1* em leucócitos com pacientes com TE apresentou correlação negativa com a apoptose induzida por VM26 (Figura 42).

Figura 42. Correlação negativa entre a expressão do gene *PRV-1* e a porcentagem de apoptose.

4.13. Análise da expressão proteica em leucócitos do sangue periférico por *Western Blot*

A detecção da proteína Bcl-x_L foi realizada nos leucócitos de indivíduos do grupo controle e nos leucócitos dos pacientes com MF e mostrou-se elevada nos pacientes (Figura 43), o que está em acordo com a expressão gênica elevada. Essa indicação foi confirmada pelo cálculo da mediana da razão dos IDV que, para os controles, foi de 0,2231 e para os pacientes foi de 0,5352. Desta forma, a expressão da proteína BCL-x_L é 2,39 vezes maior em paciente do que nos indivíduos controles.

Figura 43. Detecção da proteína Bcl-x_L em leucócitos de pacientes com Mielofibrose.

Com relação à proteína Bcl-2, não foi possível detectar diferenças evidentes na expressão tanto em pacientes com MF (Figuras 44 A e B) quanto com TE (Figuras 44 C e D), em relação aos controles.

Figura 44. Detecção da proteína Bcl-2 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.

A expressão do BID se mostrou diminuída em leucócitos de pacientes com TE e aumentada em pacientes com MF. O aumento em MF foi confirmado pelo cálculo da mediana da razão dos IDV para os controles que foi de 0,60 e para os pacientes 1,03, estando esta proteína 1,7 vezes mais expressa do que nos controles analisados (Figura 45A). A diminuição em TE foi confirmada pelo cálculo da mediana da razão dos IDV que, para os controles, foi de 4,11 e para os pacientes foi de 2,52. Desta forma, a expressão da proteína BCL-x_L é, nos pacientes, 0,64 vezes a expressão nos indivíduos controles. Esse resultado de diminuição em TE está de acordo com os resultados de expressão do gene *bid*, o que está de acordo com os resultados de expressão gênica (Figura 45B).

Figura 45. Detecção da proteína BID em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.

A expressão do Mcl-1 não mostrou diferença de expressão em leucócitos de pacientes com MF comparado aos controles (Figura 46).

Figura 46. Detecção da proteína Mcl-1 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose.

A diferença de expressão da proteína C-IAP-1 em leucócitos de pacientes com MF em comparação aos controles não ficou tão evidente visualmente, porém a média da razão dos IDV para os controle foi de 0,1366 e para os pacientes foi de 0,2444. Desta forma, a expressão da proteína C-IAP-1 é 1,79 vezes maior nos pacientes em relação à expressão observada nos indivíduos controles (Figura 47).

Figura 47. Detecção da proteína C-IAP-1 em leucócitos de pacientes com Mielofibrose.

A detecção da proteína TRAIL foi realizada para pacientes de TE e MF. No caso de TE, não é possível observar-se diferença na expressão (Figura 48A). Porém em MF, a expressão de TRAIL está diminuída, o que está de acordo com os resultados de expressão gênica (Figura 48B).

Figura 48. Detecção da proteína TRAIL em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.

A detecção da proteína C-FLIP foi realizada nos leucócitos de indivíduos do grupo controle e nos leucócitos dos pacientes com TE e não observada diferença na expressão (Figura 49).

Figura 49. Detecção da proteína C-FLIP em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial.

4.14. Detecção da expressão protéica (FAS E FAS-L) em células mononucleares do sangue periférico por Citometria de Fluxo

A expressão da proteína Fas estava diminuída nos pacientes com TE e MF (mediana: 11,05% e 12,29%, respectivamente) em comparação aos controles (19,35%) ($p < 0,0001$ e $p = 0,0242$, respectivamente). Já a expressão do Fas-L mostrou-se aumentada nos pacientes com TE e MF (2,1% e 4,5%) em comparação aos controles (0,8%) ($p = 0,0084$ e $p = 0,0020$, respectivamente). Além disso, houve diferença significativa de expressão do Fas-L entre os grupos TE e MF ($p = 0,0330$) (Figura 50).

Figura 50. Detecção da expressão do FAS e FAS-L em células mononucleares de pacientes por citometria de fluxo.

4.15. Análise da expressão de miRNA

Foi avaliada a expressão dos microRNAs hsa-miR26a, hsa-miR130b, hsa-let7d, hsa-miR21, hsa-miR29c (Tabela 28) e hsa-miR15a, hsa-miR16 e hsa-miR198 (Tabela 29) em leucócitos de pacientes com TE e MF e controles.

Tabela 28. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos referentes à expressão dos miRNA em leucócitos de TE e MF.

	miR26a	miR130b	let7d	miR21	miR29c
Controles	1,00	0,88	1,30	1,13	1,03
TE	2,27***	3,56***	2,19*	4,01***	2,77***
MF	2,15*	0,61	3,20***	0,73	1,03

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

Tabela 29. Medianas dos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos referentes à expressão dos miRNA em leucócitos de TE e MF.

	miR15a	miR16	miR198
Controles	1,00	1,16	3,00
TE	1,51*	0,86**	1,91
MF	1,96*	0,87	13,12***

*nível de significância (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001)

O miR26a estava mais expresso em TE e MF em comparação aos controles (p = 0,0006; p = 0,0183), assim como o let7d (p=0,0105; p = 0,00002), enquanto o miR130b, miR29c e miR21 estavam aumentados apenas em TE (p < 0,0001 para as três comparações) (Figura 51 A - E).

O miR15a estava mais expresso em TE e MF quando comparados aos controles (p = 0,0136; p = 0,0162), enquanto o miR16 estava significativamente aumento em TE (p = 0,0132) e o miR198 apenas em MF (p = 0,0002) (Figura 51 F - G).

Figura 51. Expressão de microRNA em leucócitos de TE, MF e controles.

A expressão do miR15a em leucócitos de pacientes com MF apresentou correlação negativa com a porcentagem de alelos JAK2V617F ($r = -0,6784$; $p = 0,0076$) e significativamente maior em pacientes JAK2V617F negativos (2,64) quando comparados aos positivos (1,22) ($p = 0,0152$) (Figura 52 A e B). A mesma correlação foi encontrada para a expressão do miR198 JAK2V617F ($r = -0,6238$; $p = 0,0151$), o qual também se apresentou maior nos pacientes JAK2V617F negativos (19,12) comparados aos positivos (8,28) ($p = 0,0366$) (Figura 52 C e D).

Figura 52. Correlação entre a expressão dos microRNA miR15a e mir198 e a mutação JAK2V617F em pacientes com Mielofibrose.

Figura 53. Correlação entre a expressão dos microRNAs miR26a, miR130b, miR29c e miR21 e genes alvo em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.

Figura 54. Correlação entre a expressão dos microRNAs miR15 e miR16 e genes alvo em leucócitos de pacientes com Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.

Um quadro com o resumo dos resultados mais relevantes está incluído nos Apêndices (Apêndice 1).

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços notáveis nos estudos da fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas cromossomo Ph negativas, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese da MF, TE e PV ainda não foram totalmente elucidados. A mutação V617F na tirosina quinase JAK2 foi o principal achado fisiopatológico nessas desordens na década e sua prevalência nos pacientes com MF e TE é de aproximadamente 50% (BAXTER et al., 2005; JONES et al., 2005; STEENSMA et al., 2005).

A ativação constitutiva da tirosina quinase JAK2, aciona além da via de sinalização de receptores de fatores de crescimento, outras vias de sinalização como a JAK/STAT, a PI3K/AKT, a MAPK e a RAS. O resultado desse processo é a ativação da transcrição de genes que induzem proliferação e inibem o processo de apoptose celular (LEVINE et al., 2007). No entanto, há casos de MF e TE em que a mutação JAK2 V617F está ausente e a doença se estabelece e desenvolve com expansão clonal. Desta forma, é possível que outras alterações genéticas e epigenéticas contribuam para a fisiopatologia das NPMC, como as mutações no éxon 12 da JAK2, (SCOTT, 2007; KAROW et al., 2007), no receptor de trombopoetina (MPL) (LASHO et al., 2006) e em TET-2 (DELHOMMEAU et al., 2009).

A literatura relata que alterações na regulação da apoptose podem contribuir ou resultar no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, auto-imunes e neoplasias, sendo ainda relevantes no perfil de resposta de pacientes aos tratamentos preconizados (DEBATIN; STAHNKE; FULDA, 2003; JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002; EVAN; VOUSDEN, 2001; KAUFMANN; EARNSHAW, 2000). Segundo Del Poeta et al.(2008), células leucêmicas têm invariavelmente anormalidades nas vias da apoptose celular, o que determina nas células leucêmicas maior sobrevida, resistência às drogas e pior fator prognóstico em pacientes com LMA.

Neste trabalho, a expressão de genes envolvidos na regulação da apoptose celular foi investigada na MF e TE. Ao analisarmos a expressão de genes relacionados à via intrínseca da apoptose em células CD34⁺ da medula óssea, foi detectado que os RNAm dos genes *a1*, *mcl-1*, *bid*, *bok* e *nox*a estava elevado em TE, assim como o nível de mRNA dos genes *a1*, *bcl-w*, *bak*, *bok* e *nox*a estava elevado em MF. Ainda em células CD34⁺ de TE, o gene *bax* apresentou sua expressão diminuída e, em MF, o gene *bcl-2* estava diminuído. Nos leucócitos do sangue periférico de pacientes com MF foi verificado aumento da expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-x_L* e dos pró-apoptóticos *bad* e *bok* enquanto que nos pacientes com TE foi observada a elevação da expressão dos anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *bcl-w*

e *bcl-x_L* e dos pró-apoptóticos *bad* e *bok*. Os pró-apoptóticos *bid* e *bim_{EL}* estavam diminuídos em leucócitos de TE.

As proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 têm papel essencial no controle da apoptose celular. Nesse sentido, nossos resultados indicam um desequilíbrio da expressão dos genes que controlam a apoptose pela via intrínseca nos pacientes com MF. O aumento da expressão dos genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-x_L* e *mcl-1* nesses pacientes pode contribuir, pelo menos em parte, para o aumento da sobrevida das células e perpetuação do clone neoplásico na doença.

Em humanos, a expressão do *a1* (*bfl-1*) é detectada em vários tipos de células hematopoéticas, células endoteliais e de músculo liso (OLSSON et al., 2007). A transcrição do *a1* depende da via do NF-κB e a expressão aumentada do *a1* foi descrita na LLC e correlacionada a refratariedade à quimioterapia (OLSSON et al., 2007).

bcl-2 é um proto-oncogene que foi identificado primeiramente em células de linfoma folicular não-Hodking de células B e que promove a tumorigênese principalmente por inibição da apoptose celular. Bcl-2 está presente na maioria dos tecidos fetais enquanto nos adultos sua expressão está restrita a células com altas taxas de proliferação e diferenciação (THOMADAKI; SCORILAS, 2006). Castro e colaboradores (2005) relataram que a diminuição da expressão deste gene e aumento dos demais genes anti-apoptóticos *bcl-x_L*, *bcl-w*, *a1*, *mcl-1* e *c-flip* em Leucemia Mielóide Crônica (LMC) estão relacionadas à progressão da doença, resistência das células leucêmicas à apoptose e à refratariedade dos pacientes ao tratamento nas fases mais avançadas da LMC. Outros estudos têm demonstrado que algumas doenças, como câncer de mama e o carcinoma gástrico apresentam altos níveis de Bcl-2 e esse achado tem sido associado com fenótipos menos malignos e de prognóstico mais favorável (FRENZEL et al, 2009).

A proteína MCL-1 tem papel crítico na sobrevivência de linfócitos e célula tronco hematopoética (DZHAGALOV; St JOHN; HE, 2007; ZHOU et al., 1998). A desregulação da expressão de *mcl-1* já foi descrita em carcinoma hepatocelular (FABREGAT et al., 2009) e em mieloma múltiplo (WUILLÈME-TOUMI et al., 2005), sendo correlacionada com a maior gravidade da doença e pior prognóstico no mieloma múltiplo (WUILLÈME-TOUMI et al., 2005). O aumento da expressão de *a1* e *mcl-1* tem sido correlacionado a resistência aos quimioterápicos (CHENG et al., 2000; WANG et al., 2008).

Alterações na expressão dos genes relacionados com a família Bcl-2 (*a1* e *mcl-1*) foram descritas ainda em blastos da medula óssea de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (ECONOMOPOULOS et al., 2008) e em Leucemia Mielóide Aguda. Nesta última doença,

foram descrito altos níveis de *bcl-2*, *bcl-x_L* e *mcl-1* (DEL POETA et al., 2008) em relação aos controles.

A respeito das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, já foi demonstrado que a perda de Bax reduz a apoptose e acelera o desenvolvimento do linfoma de célula B promovido por c-Myc (EISCHEN et al, 2001; FRENZEL et al., 2009). Com relação às NMPC, a literatura dessa temática é mais escassa. Zhang et al. (2004) descreveram diminuição da expressão de Bcl-x_L precocemente durante o processo de diferenciação de megacariócitos induzida por trombopoetina a partir de células CD34⁺ de pacientes com TE. Com relação à MF, existem poucos dados na literatura concernentes a sua fisiopatologia e apoptose. O estudo de Mesa et al (2006) não apontou diferença na expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2, MCL-1 e BCL-X_L em neutrófilos de pacientes com MF.

Outra investigação relevante foi publicada por Guglielmelli et al. (2007) que descreveram o aumento da expressão de alguns microRNAs, os miRNA-182, -183 e -190, e a correlação negativa entre a expressão desses microRNAs e de alguns genes alvos preditos, dentre eles o *bcl-2* (GUGLIELMELLI et al., 2007).

As alterações de expressão dos genes estudados podem estar associadas a desregulação das vias de transdução de sinais que tem como alvo genes relacionados à apoptose, por exemplo, as vias JAK/STAT, Akt, MAPK e NF-κB (BAKER et al., 2007; FALSCHLEHNER et al., 2007; ZHANG et al., 2000). Deste modo, devemos pensar na enorme complexidade da relação destas proteínas e das vias de regulação envolvidas: via JAK/STAT interferindo na expressão dos genes *bcl-2*, *bcl-x_L* e *mcl-1* (BAKER et al., 2007; DERENNE et al., 2002; SEPÚLVEDA et al., 2007), a proteína supressora de tumor p53 regulando a expressão dos genes *bax*, *bim* e *noxa*, por exemplo, (COTTER, 2009; MIYASHITA et al., 1994; MIYASHITA et al.; 1995, ZHAN et al, 1994), entre outras, que podem ser ativadas ao mesmo tempo na célula, na tentativa de recuperar a homeostasia celular. É importante ressaltar para o fato de que o aumento da expressão do gene não significa obrigatoriamente o aumento da proteína e sua funcionalidade. Como se sabe, as regulações pós-transcricional e pós-traducional podem impedir que a proteína seja expressa do modo esperado e, por isso, a importância do estudo dos microRNAs e expressão protéica, assim como a investigação do perfil de ativação das vias de sinalização envolvidas.

No presente estudo foi encontrado aumento da expressão dos genes *c-iap-1* e *c-iap-2* nas células CD34⁺ dos pacientes com MF e TE, assim como o aumento da expressão do gene

c-iap-2 nos leucócitos dos pacientes. De modo não esperado, os níveis de expressão dos genes *c-iap-1*, *XIAP* e *survivina* estavam diminuídos nos leucócitos pacientes com NMPC. As proteínas inibidoras de apoptose IAPs são moléculas reguladoras da via comum da apoptose por desativarem as caspases efetoras, controlando a morte mediada por receptor de morte e dano à mitocôndria. Sabe-se que altos níveis de expressão de IAP conferem proteção contra vários estímulos pró-apoptóticos em diferentes tumores sólidos e malignidades hematológicas (VUCIC; FAIRBROTHER, 2007). As proteínas da família dos IAPs apresentam padrão de expressão específico na LLC, LLA-B e no linfoma folicular. Desta forma, o *c-iap-1*, *c-iap-2* e a *survivina* poderiam ser utilizados para discriminar essas doenças (FULDA, 2009). Os IAP foram ligados ao prognóstico e resposta de tumores às drogas (TAMM; KORNBLAU; SEGALL, 2000; VUCIC; FAIRBROTHER, 2007).

Com relação à expressão dos genes ligados à via extrínseca da apoptose foi detectada a alteração no sistema Fas/FasL, com aumento da expressão dos genes *fas*, *fas-L* e *faim* nas células CD34⁺ dos pacientes com TE e MF. Sabemos que esse sistema está envolvido de modo crítico com a regulação fisiológica da sobrevivência e apoptose nas células hematopoéticas (DEBATIN; STAHNKE; FULDA, 2003; KRAMMER, 2000; BARCENA, 1996) sendo que, em condições fisiológicas, as células de medula óssea expressam baixos níveis de *fas* (BARCENA et al., 1996) e, durante a diferenciação, esse receptor passa a ser expresso nos progenitores que proliferam, servindo de regulador negativo da diferenciação em todas as linhagens (PEARL-YAFE et al., 2007).

O aumento da expressão do *fas* já foi descrito nas Síndromes Mielodisplásicas e LMC (DEBATIN; STAHNKE; FULDA, 2003). Apesar de o antígeno *fas* estar elevado nas células CD34⁺, especulamos que as células dos pacientes não estão mais sensíveis à apoptose, pois os pacientes apresentaram *superexpressão* dos genes inibidores de apoptose *faim*, *c-iap-1* e *c-iap-2*. Além disso, a análise da molécula Fas por citometria de fluxo indicou diminuição da percentagem de células marcadas nos pacientes em relação aos controles.

Na literatura há numerosos trabalhos que investigam a percentagem de células marcadas com Fas em neoplasias e leucemias. Assim sendo, Groneberg et al., descreveram o alto nível de expressão do receptor Fas (CD95) em células T de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e correlacionou esse achado com pior prognóstico e com a necessidade de tratamento quimioterápico (GRONEBERG et al., 2003) nos pacientes.

Na Leucemia Mielóide Aguda, Min et al. (2004) não encontraram correlação entre as taxas de remissão completa e a expressão de receptores Fas ou TRAIL (MIN et al., 2004). Em

LMA, FULDA (2009) relatou que a expressão do *fas* correlaciona-se positivamente com a resposta à quimioterapia. Corroborando com essa afirmação Aref et al. (2004), relataram que a expressão de *fas* e *bcl-2* correlaciona-se ao tipo de LMA, como por exemplo a M5 (Classificação segundo Grupo Franco – Americano - FAB) e com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) do tipo T. Ainda nesse trabalho, os autores mostraram que pacientes com LLA responsivos à quimioterapia possuem menor expressão de *fas* e *bcl-2* quando comparados aos pacientes refratários (AREF et al., 2004).

O aumento na expressão de *fas-L* tem sido associado ao escape das células neoplásicas a resposta do sistema imune. Esse mecanismo foi descrito para alguns tipos de tumores (NAGATA, 1999) e leucemias, nas quais as células leucêmicas expressam *fas-L* em sua superfície celular. Essa molécula induziria a morte das células efetoras da resposta imune (Natural killer e linfócito T) que expressassem o agonista Fas (JIN; El-DEIRY, 2005). Essa idéia se baseou em achados da expressão do *fas-L* em sítios imunoprivilegiados como o olho e células hepáticas e foi confirmada em modelos animais (HAHNE et al., 1996). No entanto, foi mostrado que células de tumores expressando *fas-L* eram mortas por neutrófilos infiltrantes, o que dificultou a conclusão sobre o assunto (ALLISON et al, 1997; COTTER, 2009).

Nas análises realizadas nesse estudo, foi detectada a diminuição da expressão do *fas-L* nos leucócitos dos pacientes e nas células mononucleares do pacientes elevação do antígeno FASL detectado por citometria de fluxo.

A expressão do gene *dr4* está aumentada nas células CD34⁺ e leucócitos de pacientes com TE, enquanto que a expressão do gene *trail* está diminuída nos leucócitos de TE e MF. TRAIL é uma proteína transmembrana do tipo I mais expressa em células do sistema imune e que tem papel importante na homeostase das células T e NK e na morte celular mediada por célula T. Existem quatro tipos de receptores descritos TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1) e TRAIL-R4 (DcR2), além do receptor solúvel osteoprotegerina (OPG) (FALSCHLEHNER et al., 2007). Mutações no DR4 têm sido correlacionadas às neoplasias (ex. polimorfismos câncer de bexiga) (KIMBERLEY; SCREATON, 2004). Também foi descrito que células de pacientes com LLC e linfoma de manto utilizam quase que exclusivamente o receptor DR4 (MACFARLANE et al, 2005). TRAIL pode ativar a via de sinalização não pró-apoptótica como NF- κ B, PKB/Akt e MAPK. NF- κ B induz expressão de *c-iap-1*, *c-iap-2*, XIAP, *c-flip*, *bcl-x_L* e DcR1 (WAJANT, 2004).

A utilização de TRAIL na terapia de neoplasias e a resistência a esse tratamento têm sido descritas (HAN et al., 2008; ALMASAN; ASHKENAZI, 2003). A elevada expressão de

moléculas anti-apoptóticas como c-FLIP e Mcl-1 foi proposta para explicar essa resistência das células à apoptose (WANG et al., 2008).

É interessante ressaltar que neste estudo foram encontradas diferenças significativas na expressão dos genes *c-iap-2* e *fas-L* entre os grupos de pacientes com MF e TE.

Correlacionar os dados de expressão gênica e parâmetros hematológicos com a presença e ausência da mutação no gene da JAK2 (V617F), assim como com a porcentagem de alelos mutados foram objetivos desse trabalho. Correlações entre a presença da mutação JAK2V617F e a expressão de alguns genes anti-apoptóticos e entre a porcentagem de alelos mutados e a expressão de vários genes foram detectadas.

A porcentagem de alelos mutados JAK2V617F correlacionou-se com o a contagem de leucócitos em TE, dado esse que está de acordo com vários artigos da literatura (PALANDRI et al., 2009; GUGLIELMELLI et al., 2009; LUCIA et al., 2008).

Apesar de mais estudos serem necessários, o aumento na contagem de leucócitos em TE tem sido sugerido como possível marcador de pior prognóstico. Desta forma, correlacionamos o número de leucócitos com a expressão gênica e encontramos uma correlação negativa com os genes pró-apoptóticos *bad* e *nox* em TE e a correlação positiva com os níveis de RNAm dos genes anti-apoptóticos *mcl-1*, *c-flip* e *faim* em TE.

A contagem de plaquetas é um parâmetro para definição de risco dos pacientes com TE (HELMANN, 2008). Quando analisada correlações entre expressão gênica e a contagem de plaquetas foi encontrada correlação positiva para os genes anti-apoptóticos *al*, *mcl-1* e *bcl-x_L*, e correlação negativa para os genes *bim_{EL}* e *bok*.

Quando analisamos a correlação da expressão gênica com parâmetros hematológicos, detectamos que a expressão dos genes *bad* e *bak* se correlacionou com os níveis de hemoglobina e hematócrito dos pacientes com MF. A hemoglobina é utilizada como um dos parâmetros para definir o escore prognóstico para pacientes com MF (CERVANTES; PASSAMONTI; BAROSI, 2008).

De modo interessante, foi observada a correlação positiva entre a expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x_L*, *c-iap-2*, *XIAP*, *survivina*, *faim* e *c-flip* e o aumento dos baços nos pacientes. Para os genes pró-apoptóticos *bax* e *bik* foi encontrada correlação negativa com o aumento do baço dos pacientes com TE e MF. A esplenomegalia é uma das co-morbidades mais frequentes nos pacientes, principalmente em pacientes com MF.

Análises de expressão de proteínas por *Western Blot* indicaram aumento da expressão de BCL-XL e diminuição de TRAIL em leucócitos de pacientes com MF e a diminuição de BID em leucócitos de pacientes com TE. Esses resultados concordam com os dados de

expressão desses genes obtidos nesses pacientes. O nível do C-IAP-1 estava elevado em pacientes com MF, o que está de acordo com o perfil de expressão gênica.

A análise expressão do gene *PRV-1* foi realizada em células CD34⁺ e leucócitos de pacientes com TE e MF com relação ao grupo controle e foi observada a *superexpressão* desse gene nos leucócitos dos pacientes. PRV-1 é um receptor de superfície celular, membro da família de receptor uPAR que foi descrito inicialmente mais expresso na Policitemia Vera e em alguns pacientes de TE, mas não em indivíduos saudáveis ou com eritrocitose secundária ou Leucemia Mielóide Crônica (TEMERINAC et al., 2000; KLIPPEL et al., 2003; GRIESSHAMMER et al., 2004). Fisiologicamente, é expresso na medula óssea, em neutrófilos mielócitos, metamielócitos eritroblastos jovens e eritroblastos (KLIPPEL et al., 2003; DILLON et al., 2008). Segundo dado da literatura está envolvido em proliferação celular e relacionado às vias de sinalização JAK/STAT e Src (DILLON et al., 2008).

Devido ao aumento da expressão de PRV-1 detectado nos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas, mais recentemente essa molécula tem sido colocada com importância para o diagnóstico dos pacientes com TE, juntamente com a mutação da JAK (MELIS et al., 2009). Há dados na literatura que apontam para o envolvimento do PRV-1 na ativação das vias de sinalização de citocinas e, portanto, para a sua associação com a patogênese das NMPC (DILLON et al., 2008). Nesse contexto, especulamos que a expressão do *PRV-1* seria importante na caracterização do perfil clínico-laboratorial dos pacientes que assemelhariam ao fenótipo da Policitemia Vera.

Como descrito nos resultados, a expressão do gene *PRV-1* estava maior em pacientes positivos para a mutação JAK2 e se correlacionou de maneira positiva com a porcentagem de alelos mutados JAK2, corroborando com dados da literatura que indicam que maiores porcentagens de alelos mutados estariam associadas ao aumento de expressão do *PRV-1* (LARSEN et al., 2007; KRALOVICS, 2003; LIPPERT et al., 2006; DILLON et al., 2008). Além disso, a expressão desse gene correlacionou-se com a contagem de leucócitos e plaquetas dos pacientes, reforçando a especulação do envolvimento de PRV-1 na fisiopatologia dessas doenças (GRIESSHAMMER et al., 2004).

Neste estudo, foi realizada a determinação da porcentagem de apoptose de linfócitos do sangue periférico de pacientes com MF e TE após a indução com drogas que possuíam diversos mecanismos de ação. Como já mencionado vários estímulos induzem apoptose, como sinalização pelos receptores de morte (ativação de Fas, TRAIL e etc.), radiação UV e drogas citotóxicas que disparam a via intrínseca da morte celular. Dentre as drogas utilizadas para desencadear a apoptose, a Actinomicina D (ACT-D) e a Cicloheximida (CHX) inibem a

síntese de DNA e síntese protéica. Dados da literatura demonstram que essas drogas promovem a amplificação da apoptose mediada por FAS e TRAIL e diminuem a expressão do gene anti-apoptótico *c-flip* (LOS et al., 1997). Além disso, a ACT-D reduz a síntese de RNA ribossomal promovendo ativação da via intrínseca da apoptose (KALOUSEK et al., 2007), interfere na ligação do fator de transcrição NF- κ B ao DNA e aumenta a expressão de algumas moléculas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (WANG et al., 2007; DEBATIN et al., 2008). Outras drogas utilizadas para induzir apoptose foram Etoposídeo (VP-16) e Teniposídeo (VM-26), que interferem com na função da topoisomerase II e sensibilizam as células ao sinal apoptótico disparados após ativação dos receptores do ligante TRAIL (WAJANT et al., 2000). A Citarabina (ARA-C) interfere na síntese de DNA, mais precisamente na fase S do ciclo celular bloqueando a progressão para a fase G1, provavelmente inibindo a DNA polimerase durante a replicação e causando dano ao DNA (TABAK, 2001). A estaurosporina é um inibidor de proteína quinase de amplo espectro que induz disfunção mitocondrial e a apoptose em várias linhagens celulares (WANG et al., 2007). Quando a metodologia Anexina-V FITC foi empregada para determinar a porcentagem de apoptose em linfócitos dos pacientes, os valores de porcentagem de linfócitos em apoptose nos pacientes foi menor do que no grupo Controle. Esse dado indica que os linfócitos dos pacientes apresentam resistência às drogas indutoras de apoptose. A resistência dos tumores às drogas empregadas nas terapias de doenças neoplásicas é observada frequentemente e pode estar atrelada às alterações na expressão dos genes envolvidos na via intrínseca e extrínseca da apoptose. Além disso, a correlação entre a expressão dos genes relacionados à apoptose e a resistência das células à apoptose sugere que a desregulação da expressão dessas moléculas, e do gene PRV-1, estão associadas a fisiopatologia das NMPC.

Estudos da expressão de miRNA em linhagens celulares e amostras de pacientes têm revelado que em várias doenças hematológicas e não hematológicas ocorre a expressão aberrantes dos mesmos (CALIN et al., 2004; CALIN et al., 2005; CHOONG; YANG; MCNIECE, 2007; BRUCHOVA et al., 2008) e ainda se correlaciona essa expressão com o fenótipo da doença (DEBERNARDI et al., 2007; VENTURINI et al., 2007; GRAMANTIERI et al., 2007; BURCHOVA et al., 2008). Como abordado na introdução, estudos têm descrito genes supressores de tumor, como o p53 e proteínas reguladoras da apoptose como alvos de microRNAs (HE et al., 2007). Careta (2007) relatou que a “superexpressão” da molécula *c-flip*, na LLC, estava ligada a diminuição da expressão de miR-96, miR-183 e miR-20. Esse autor sugere que esses miRNAs modulam a expressão gênica de *c-flip*, potencializando a proliferação e inibindo a apoptose dos linfócitos leucêmicos do tipo B de pacientes com LLC.

Guglielmelli et al. (2007) descreveram vários microRNAs diferencialmente expressos na MF e Bruchova et al. (2007 e 2008) relataram a expressão anormal de microRNAs na PV. Em nossas análises, os miRNA26a, let 7d e miR15a estavam significativamente aumentados nos leucócitos de pacientes com TE e MF, assim como o miR130b estava elevado em TE e o miR198 aumentado em MF. O miR16 apresentou expressão diminuída em TE. A maioria dos microRNAs estudados apresentaram correlação com genes estudados e preditos como alvo. Porém, não foi possível especular que as alterações de expressão gênica encontradas nos pacientes estão relacionadas às alterações na expressão dos microRNA estudados.

6. CONCLUSÕES

- (1) Os resultados obtidos desse estudo indicam que os pacientes com TE e MF:
 - Apresentam maior expressão dos genes anti-apoptóticos *c-iap-1*, *c-iap-2*, *a1*, *mcl-1*, *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-x_L* e diminuição dos pró-apoptóticos *bax*, *bid* e *bim_{EL}* em relação aos controles;
 - Possuem alterações na expressão dos genes ligados à via de receptor de morte como a elevação do gene *dr4* em células CD34⁺ e leucócitos dos pacientes de TE e diminuição do gene *trail* em leucócitos de TE e MF;
- (2) A expressão dos genes reguladores da apoptose em TE e MF está associada ao status da JAK2V617F e existe correlação entre a expressão desses genes com porcentagem de alelos mutados;
- (3) O aumento da expressão do gene PRV-1 em leucócitos de TE e MF está associado aos *status* da mutação JAK2 V617F e com a expressão dos genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-w*, *c-iap-2* e pró-apoptóticos *bik* e *bax*;
- (4) Os apoptomirs - miRNA26a, let 7d e miR15a, miR130b, miR198 e miR16 - estão diferencialmente expressos em leucócitos de TE e MF em relação aos controles;
- (5) Os linfócitos dos pacientes são mais resistentes à indução de apoptose por Actinomicina, Cicloheximida, Estaurosporina, Citarabina, Etoposídeo e Teniposídeo que os do grupo controle;
- (6) A expressão de vários genes envolvidos na regulação da apoptose correlaciona-se aos parâmetros clínico-laboratoriais como a contagem de leucócitos, plaquetas, hematócrito, hemoglobina e aumento do baço.

REFERÊNCIAS

AHMED, A.; CHANG-CHE, C. Chronic Idiopathic Myelofibrosis: clinicopathologic features, pathogenesis, and prognosis. **Arch Pathol Lab Med**, Chicago: v. 130, p. 1133-2, Aug 2006.

ALLISON, J. et al. Transgenic expression of CD95 ligand on islet β cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, Washington, v. 94, p. 3943-47, Jul 1997.

ALMASAN, A.; ASHKENAZI, A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. **Cytokine Growth Factor Rev**, Oxford: v. 14, p. 337-48, Jun 2003.

ALTURA, R. A.; HEAD, D. R.; WANG, W. C. Long-term survival of infants with idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol**, Oxford: v. 109, p. 459-462, May 2000.

ARANA-YI, C. et al. Advances in the therapy of chronic idiopathic myelofibrosis. **Oncologist**, Dayton: v. 11, p. 929-43, Sep 2006.

AREF, S. et al. Assessment of bcl-2 expression as modulator of fas mediated apoptosis in acute leukemia. **Hematology**, Banbury: v. 9, n. 2, p. 113-21, Apr 2004.

ASHKENAZI, A. et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. **J Clin Invest**, New Haven: v. 104, p. 155-62, Jul 1999.

BAKER, S. J.; RANE, S. G.; REDDY, E. P. Hematopoietic cytokine receptor signaling. **Oncogene**, Basingstoke: v. 26, n. 47, p. 6724-37, Oct 2007.

BARBUI, T. et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. **J Clin Oncol**, New York: v. 29, n. 23, p. 3179-84, Aug 2011.

BÁRCENA, A et al. Expression of Fas/CD95 and Bcl-2 by primitive hematopoietic progenitors freshly isolated from human fetal liver. **Blood**, London: v. 88, n. 6, p. 2013-25, Sep 1996.

BAROSI, G.; AMBROSETI, A.; FINELLI, C. et al. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. **Br J Haematol**, Oxford: v. 104, p. 730-37 Mar 1999.

BAROSI, G. et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Blood**, London: v. 98, n. 12, p. 3249-55, Dec 2001.

BAROSI, G. et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. **Leukemia**, London, v. 22, n. 2, p. 437-8, Feb 2008.

BAROSI, G.; ROSTI, V. Novel Strategies for patients with chronic myeloproliferative disorders. **Curr Opin Hematol**, Philadelphia: v. 16, p. 129-34, Mar 2009.

BAXTER, E.J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK 2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, London: v. 365, p. 1054-61, Mar 2005.

BEER, P. A. The pathogenesis of essential thrombocythemia. **Curr Opin Hematol**, Philadelphia: v. 18, n. 5, p. 323-9, Sep 2011.

BEEZHOLD, K.J.; CASTRANOVA, V.; CHEN, F. Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. **Mol Cancer**. London: v. 1, p. 134, Jun 2010.

BENCH, A.J.; ERBER, W.N.; SCOTT, M.A. Molecular genetic analysis of hematological malignancies: I. Acute leukaemias and myeloproliferative diseases. **Clin. Lab. Haematol**, Oxford: v. 27, p. 148-171, Jun 2005.

BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspases activation. **Curr Opin Cell Biol**, Philadelphia: v. 15, p. 725-31, Dec 2003.

BOCK, O. et al. Bone Morphogenetic Proteins Are Overexpressed in the Bone Marrow of Primary Myelofibrosis and Are Apparently Induced by Fibrogenic Cytokines. **Am J Pathol**, Philadelphia: v. 172, p. 951-60, Apr 2008.

BOGANI, C. et al. B-, T-, and NK-cell lineage involvement in JAK2V617F-positive patients with idiopathic myelofibrosis. **Haematologica**, Pavia: v. 92, p. 258-9, Feb 2007.

BONDUEL, M. et al. Familial idiopathic myelofibrosis and multiple hemangiomas. **Am J Haematol**, New York: v. 59, p. 175-77, Oct 1998.

BOYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scand J Immunol**, Oslo: Suppl. 5, p. 9-15, Jun 1976.

BRUCHOVA, H. et al. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. **Exp Hematol**, Copenhagen: v. 35, p. 1657-67, Nov 2007.

BRUCHOVA, H.; MERKEROVA, M.; PRCHAL, J.T. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. **Haematologica**. Pavia: v. 93, p. 1009-16, Jul 2008.

CACCIOLA, R. R. et al. Treatment of symptomatic patients with essential thrombocythemia: effectiveness of anagrelide. **Am J Hematol**, New York: v. 80, n. 1, p. 81-3, Sep 2005.

CALIN, G.A. et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci USA**. Washington: v. 101, p. 11755-60, Aug 2004

CALIN, G. A. et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**. Boston: v. 353, p. 1793-80, Oct 2005.

CALIN, G.A. et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington: v. 105, p. 5166-71, Apr 2008.

CAMPBELL, P. J. et al. The V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. **Blood**, New York: v. 107, p. 2098–2100, Mar 2006.

CAMPOS, L. et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. **Blood**, New York: v. 81, p. 3091–96, Jun 1993.

CANDE, C. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? **J Cell Science**, London: v. 115, p.2427-34, Dec. 2002.

CARBUCCIA, N. et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, London: v. 23, n. 11, p. 2183-6, Nov 2009.

CARETA, F.P. Expressão de genes envolvidos na proliferação celular e apoptose na leucemia linfocítica crônica. Dissertação de Mestrado em clínica médica, FMRP-USP, 75p., 2007.

CASTRO, F.A. et al. Overexpression of the anti-apoptotic genes *mcl-1*, *bcl-w*, *bcl-x_L* and *a1* is correlated with to Chronic Myelogenous Leukemia progression and resistance to Gleevec. American Society Hematology Congress. v. 106, abstract 2880, Nov 2005.

CASTRO-MALASPINA, H.; GAY, R.E.; JHANWAR, S.C. Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. **Blood**, New York: v. 59, p. 1046-1054, May 1982.

CERVANTES, F.; BAROSI, G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnosis, prognostic factors, and staging. **Semin Oncol**, New York: v. 32, p. 395-402, Aug 2005.

CERVANTES, F.; PASSAMONTI, F.; BAROSI, G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. **Leukemia**, London: n. 22, p. 905-14, May 2008.

CHENG, Q. et al. Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-kappaB inhibition. **Oncogene**, Basingstoke: v. 19, p. 4936-40, Oct 2000.

CHEUNG, B. et al. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. **Br J Haematol**, Oxford: v.132, p. 244-45, Jan 2006.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends Cell Biol**, Cambridge: n. 18, p. 157-64, Apr 2008.

CHOONG, M. L.; YANG, H. H.; MCNIECE, I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. **Exp Hematol**. Philadelphia: v. 35, p. 551-64, Apr 2007.

CIMMINO, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington: v. 27, p. 13944-9, Sep 2005.

COOPER, W. A. et al. Role and prognostic significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptor DR5 in nonsmall-cell lung cancer and precursor lesions. **Cancer**, New York: v. 113, p. 135-42, Jul 2008.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, London: v. 2, p. 647-56, Sep 2002.

COTTER, T. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field **Nature Reviews. Cancer**, London: v. 9, p. 501-507, July 2009.

DAMESHEK, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. **Blood**, London: v. 6, n. 4, p. 372-5, Apr 1951.

DE JONG, D. et al. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. **Cancer Res**, Chicago: v. 54, p. 256-60, Jan 1994.

DEBATIN, K.M.; STAHNKE, K.; FULDA, S. Apoptosis in hematological disorders. **Semin Cancer Biol**, Philadelphia: v.13, p.149-58, Apr 2003.

DEBERNARDI, S. et al. MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. **Leukemia**, London: v. 21, n. 5, p. 912-6, May 2007.

DEL POETA, G.; DEL PRÍNCIPE, M.I.; VENDITTI, A. et al. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular target drugs in acute myeloid leukemia. **Curr Cancer Drug Targets**, Hilversum: n. 8, p. 207-22, May 2008.

DELHOMMEAU, F. et al. Evidence that the *JAK2* G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. **Blood**, New York: v. 109, p. 71-77, Jan 2007.

DELHOMMEAU, F.; JEZIOROWSKA, D.; MARZAC, C.; CASADEVALL, N. Mutation in TET2 in myeloid cancers. **N Engl J Med**, Boston: v. 360, n. 22, p. 2289-301, May 2009.

DELHOMMEAU, F. Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. **Int J Hematol**, Amsterdam: v. 91, n. 2, p. 165-73, Mar 2010.

DELIGEZER, U.; DALAY, N. Expression of the TRAIL Receptors in Blood Mononuclear Cells in Leukemia. **Pathol Oncol Res**, Budapest: v. 13, p. 290-94, Dec 2007.

DERENNE, S. et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-xL is an essential survival protein of human myeloma cells. **Blood**, London: v. 100, p. 194-99, July 2002.

DILLON, M. et al. Expression of the GPI-anchored receptor Prv-1 enhances thrombopoietin and IL-3-induced proliferation in hematopoietic cell lines. **Leuk Res**. New York: v. 5, p. 811-9, May 2008.

DOMEN, J.; WEISSMAN, I.L. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kit/c-Kit signaling the other. **J Exp Med**, New York: v. 192, p. 1707-18, Dec 2000.

DZHAGALOV, I.; St JOHN, A.; HE, YW. The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. **Blood**, London: v. 109, p. 1620-6, Feb 2007.

ECONOMOPOULOS, U. C. et al. Analysis of apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS). **Leuk Res**, New York: n. 32, p. 61-9, Jan 2008.

EISCHEN, C.M. et al. Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis. **Mol Cell Biol**, Washington: v. 21, p.:7653–62, Nov 2001.

ENGEL, W. et al. Clonal occurrence of a chromosome Dq-in myelosclerosis with myeloid metaplasia. **Humangenetik**, Berlin: v. 6, p. 335-7, 1968.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**, London: v. 6, p. 259-69, Apr 2006.

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, London: v. 411, p.342–8, May 2001.

FABREGAT, I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **World J Gastroenterol**, Beijing: v. 15, p. 513-20, Feb 2009.

FALSCHLEHNER, C. et al. TRAIL signaling: Decisions between life and death. **Int J Biochem Cell Biol**, Amsterdam: v. 39, p. 1462-75, Feb 2007.

FESTJENS, N. et al. Caspase-containing complexes in the regulation of death cell and inflammation. **J Biol Chem**, San Francisco: v. 387, p.1005-1016, Aug. 2006.

FINAZZI, G.; BARBUI, T. Risk-adapted therapy in essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Blood Rev**, London: v. 19, n. 5, p. 243-52, Sep 2005.

FRENZEL, A. et al. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. **Apoptosis**, London: v. 14, p. 584-96, Apr 2009.

FULDA, S. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis**, London: v. 14, p. 409-23, Apr 2009.

FULDA, S.; DEBATIN, K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, Basingstoke: v. 25, p. 4798-811, Aug 2006.

GANGAT, N. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. **Leukemia**, v. 21, n. 2, p. 270-6, Feb 2007.

GANGAT, N. et al. Cytogenetic abnormalities in essential Thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. **Eur J Haematol** Oxford: v. 83, p. 17-21, Feb 2009.

GANGAT, N. et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. **J Clin Oncol**, New York: v. 29, n. 4, p. 392-7, Feb 2011.

GÉLINAS, C.; WHITE, E. BH-3 only proteins in control: specificity regulates Mcl-1 and Bak mediated apoptosis. **Genes Dev**, New York: v. 19, p. 1263-68, Jun 2005.

GELSI-BOYER, V. et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. **Br J Haematol**, Oxford: v. 151, n. 4, p. 365-75, Nov 2010.

GIRODON, F. et al. Incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the Cote d'Or area, France, during 1980–99. **J Intern Med**, Oxford: v. 258, p. 258-90, Jul.2005.

GIRODON, F. et al. Significant increase in the apparent incidence of essential thrombocythemia related to new WHO diagnostic criteria: a population-based study. **Haematologica**, Pavia: v. 94, p. 865-9, Jun 2009.

GRAMANTIERI, L. et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**. Chicago: v. 67, p. 6092-9, Jul 2007.

GRAND, F. H. et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, London: v. 113, n. 24, p. 6182-92, Jun 2009.

GREEN, A.R.; VASSILIOU, G.S.; CURTIN, N. et al. Management of the myeloproliferative disorders: distinguishing data from dogma. **Hematol J**, London: v. 5, p. S126-S132, 2004.

GRIESSHAMMER, M. et al. PRV-1 mRNA expression discriminates two types of essential thrombocythemia. **Ann Hematol**. Berlin: v. 83, p. 364-70, Apr 2004.

GRONEBERG, C. et al. Clinical relevance of CD95 (Fas/Apo-1) on T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Exp Hematol**, Copenhagen: v. 31, p. 682-5, Aug 2003.

GUGLIELMELLI, P. et al. Anaemia characterizes patients with myelofibrosis harboring Mpl mutation. **Br J Haematol**, Oxford: v.137, p. 244-47, May 2007.

GURBUXANI, S.; VYAS, P.; CRISPINO, J. D. Recent insights into the mechanism of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. **Blood**, New York: v. 103, p. 399-406, Jan 2004.

HAHNE, M. et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. **Science**, Washington: v. 274, p. 1363–166, Nov 1996.

HAN, J.; HOU, W.; GOLDSTEIN, L. A. Involvement of protective autophagy in TRAIL-resistance of apoptosis defective tumor cells. **J Biol Chem**, Baltimore: v.11, p. 19665-77, Jul 2008

HARRISSON, C. N.; GREEN, A.R. Essential Thrombocythemia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am**, Philadelphia: v. 17, p. 1175-1190, Oct 2003.

HE, X.; HE, L.; HANNON, G.J. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. **Cancer Res**, Chicago: v. 67, p. 11099-101, Dec 2007.

HELMANN, A. Myeloproliferative syndromes: diagnosis and therapeutic options. **Polskie Achivvum Mycyny Wwnetrznej**, Warszawa: v. 118, p. 756-60, Dec 2008.

HERNÁNDEZ-BOLUDA, J. C. et al. Clinical evaluation of the European LeukaemiaNet criteria for clinicohaematological response and resistance/intolerance to hydroxycarbamide in essential thrombocythaemia. **Br J Haematol**, Oxford: v. 152, n. 1, p. 81-8, Jan 2011.

HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, London: v. 98, n. 9, p. 2603-14, Nov 2001. ISSN 0006-4971.

HEXNER, E. O. et al. Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. **Blood**, London: v. 111, n. 12, p. 5663-71, Jun 2008.

HOCKENBERY, D. et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, London: v. 348, p.334-6, Nov 1990.

HUSSEIN, K. et al. Different involvement of the megakaryocytic lineage by the JAK2V617F mutation in Polycythemia vera, essential thrombocythemia and chronic idiopathic myelofibrosis. **Ann Hematol**, Berlin: v. 86, p.245-53, Apr 2007.

JAMES C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. **Nature**, London: v. 434, p.1144-82, Jul 2005.

JAUREGUI, M. P. et al. The role of beta-catenin in chronic myeloproliferative disorders. **Hum Pathol**, Philadelphia: v. 39, p. 1454-58, Oct 2008.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. Overview of cell death signaling pathway. **Cancer Biol Ther**, Georgetown: v. 4, p. 139-63, Feb 2005.

JOHANSSON, P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Semin Thromb Hemost**, New York: v. 32, p. 171-73, Apr 2006.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A.A.; LOWE, S.W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, Cambridge: v.108, p.153-64, Jan 2002.

JONES, A. et al. Widespread occurrence of JAK2- V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. **Blood**, New York: v. 106, p. 2162-68, Sep 2005.

JONES, L. C. et al. RARbeta2 is a candidate tumor suppressor gene in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Oncogene**, Basingstoke: v. 23, p. 7846-53, Oct 2004.

KALOUSEK, I. et al. Actinomycin D upregulates proapoptotic protein Puma and downregulates Bcl-2 mRNA in normal peripheral blood lymphocytes. **Anticancer Drugs**, London: v. 18, p. 763-72, Aug 2007.

KARAKAS, T. et al. High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. **Ann Oncol**, London: v. 9, p. 159-65, Feb 1998.

KAROW, A. et al. JAK2 mutation other than V617F: a novel mutation and mini review. **Leuk Res**, New York: v. 32, p. 365-66, Feb 2008.

KAUFMANN, S.H.; EARNSHAW, W.C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp Cell Res**, New York: n. 256, p.42-9, Apr 2000.

KAUSHANSKY, K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. **Blood**, New York: v. 105, p. 4187-90, Jun 2005.

KAUSHANSKY, K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of Jak2: Dameshek's 54 years old speculation comes of age. **Best Pract Res Clin Haematol**, London: v.20, p.5-12, Mar 2007.

KAWAMATA, N.; OGAWA, S.; YAMAMOTO, G. et al. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. **Exp Hematol**, Copenhagen: v. 36, p. 1471-92, Nov 2008.

KAWASAKI, H. et al.. Hypersensitivity of megakaryocyte progenitors to thrombopoietin in essential thrombocythemia. **Am. J. Hematol**, New York: v. 68, p. 194-197, 2001.

KHWAJA, A. The role of Janus Kinase in haemopoiesis and haematological malignancy. **Br J Haematol**, Oxford: v. 134, p. 366-84, Aug 2006.

KIMBERLEY, F. C.; SCREATON, G. R. Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. **Cell Res**, Beijing: v. 14, p. 359-72, Oct 2004

KIRKIN, V.; JOOS, S.; ZORNIG, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochem Biophys Acta**, Amsterdam: v. 1644, p. 229-49, Mar 2004.

KISSELEVA, T. et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene**, Amsterdam: v. 285, p. 1-24, Feb 2002.

KLIPPEL, S. et al. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. **Blood**, London: v. 15, p. 3569-74. Nov 2003.

KLUCK, R. M. et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, Washington: v. 275, p. 1132-36, Feb 1997.

KOTA, J.; CACERES, N.; CONSTANTINESCU, S. N. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, London: v. 22, p. 1828-40, Oct 2008.

KRAJEWSKI, S. et al. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. **Cancer Res**, Chicago: v. 53, p. 4701-14, Oct 1993.

KRALOVICS, R. et al. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. **Blood**, New York: v. 102, p. 1869-71, Sep 2003.

KRALOVICS, R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, Boston: v. 352, p. 1779-90, Apr 2005.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, London: n. 407, p. 789-95, Oct 2000.

KROGER, N.; MESA, R. A. Choosing between stem cell therapy and drugs in myelofibrosis. **Leukemia**, London: v. 22, p. 474-86, Mar 2008.

KUMAR, C. et al. Kinase drug discovery approaches in chronic myeloproliferative disorders. **Oncogene**, Basingstoke: v. 18, p.2305-13, Jun 2009.

LARSEN, T.S. et al. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis-impact on disease phenotype. **Eur J Haematol**, Copenhagen: v. 79, p. 508-15, Dec 2007.

LASHO, T.L. et al. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. **Br J Haematol**, Oxford: v. 135, p. 683-7, Dec 2006.

LATAILLADE, J. J. et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. **Blood**, London: v. 112, n. 8, p. 3026-35, Oct 2008.

LE BLANC, H.N.; ASHKENAZI, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. **Cell Death Differ**, London: v. 10, p. 66-75, Jan 2003.

LESSARD, J. and SAUVAGEAU, G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. **Nature**, London: v. 423, p. 255-260, May 2003.

LEVINE RL. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, Cambridge: v. 7, p. 387-97, Apr 2005.

LEVINE, R. L. et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nat Rev Cancer**, London: v. 7, p. 673-83, Sep 2007.

LIPPERT, E. et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Blood**, New York: v. 108, p. 1865-67, Dec 2006.

LOS, M. et al. Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). **Blood**, London: v. 90, n. 8, p. 3118-29, Oct 1997.

LUCIA, E. et al. The incidence of JAK2 V617F mutation in bcr/abl-negative chronic myeloproliferative disorders: assessment by two different detection methods. **Leuk Lymphoma**, London: v. 49, p. 1907-15, Oct 2008.

MACFARLANE, M. et al. TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies. **Cancer Res**, Baltimore: v. 65, p. 11265-70, Dec 2005.

MASSA, M. et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. **Blood**, New York: v. 105, p. 199-206, Jan 2005.

MELIS, S. et al. JAK2 V617F mutation and PRV-1 overexpression: relevance in the diagnosis of polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. **Acta Clin Belg**, Bruxelles: v. 64, p. 429-33, Sep-Oct 2009.

MESA, R. A. et al. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Blood**, New York: v. 96, p. 3374-80, Nov 2000.

MESA, R. A. et al. A phase II trial of pirfenidone (5-methyl- 1-phenyl-2-[1H]-pyridone), a novel anti-fibrosing agent, in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Br J Haematol**; Oxford: v. 114, p. 111-13, Jul 2001.

MESA, R. A. et al. Janus kinase 2 (V617F) mutation status, signal transducer and activator of transcription-3 phosphorylation and impaired neutrophil apoptosis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Leukemia**, London: v. 20, p. 1800-82, Oct 2006.

MESA, R. A. et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). **Leuk Res**, New York: v. 31, p. 737-40, Jan 2007.

MESA, R. A. New drugs for the treatment of myelofibrosis. **Curr Hematol Malig Rep**, Philadelphia: v. 5, n. 1, p. 15-21, Jan 2010.

MIKKOLA, H. K. et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. **Nature**, London: v. 421, p. 547-51, Jan 2003.

MIN, Y. J. et al. Prognostic significance of Fas (CD95) and TRAIL receptors (DR4/DR5) expression in acute myelogenous leukemia. **Leuk Res**, New York: v. 28, n. 4, p. 359-65, Apr 2004.

MIYASHITA, T. et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, Basingstoke: v. 9, n. 6, p. 1799-805, Jun 1994.

MIYASHITA, T.; REED, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, Cambridge: v. 80, n. 2, p. 293-9, Jan 1995.

NAGATA, S. Fas ligand-induced apoptosis. **Annu Rev Genet**, Palo Alto: v. 33, p. 29-55, 1999.

NAJEAN, Y.; DRESCH, C.; RAIN, J. D. The very-long term course of polycythaemia: a complement to the previously published data of the Polycythemia Vera Study Group. **Br J Haematol**, Oxford: v. 86, p. 233-35, Jan 1994.

NGUYEN, M. et al. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. **J Biol Chem**, San Francisco: v. 268, p. 25265-68, Dec 1993.

O'MALLEY, D. P. et al. Analysis of loss of heterozygosity and X chromosome inactivation in spleens with myeloproliferative disorders and acute myeloid leukemia. **Mod Pathol**, Baltimore: v. 18, p. 1562-68, Dec 2005.

O'SHEA, J. L.; GADINA, M.; SCHREIBER, R.D. Cytokine signaling in 2002: new surprise in Jak/Stat pathway. **Cell**, Cambridge: v. 109 (suppl), p. 121-31, Apr 2002.

OLSSON, A. et al. Upregulation of *bfl-1* is a potential mechanism of chemoresistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Cancer**, London: v. 17, p. 769-77, Sep 2007.

ORKIN, S. H.; ZON, L.I. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. **Nat Immunol**, New York: v. 3, p. 323-28, Apr 2002.

PALANDRI, F. et al. Long-term follow-up of 386 consecutive patients with essential thrombocythemia: safety of cytoreductive therapy. **Am J Hematol**, New York: v. 84, p. 215-20, Apr 2009.

PARDANANI, A. et al. JAK inhibitor therapy for myelofibrosis: critical assessment of value and limitations. **Leukemia**, London: v. 25, n. 2, p. 218-25, Feb 2011.

PARDANANI, A. D. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. **Blood**, London: v. 108, n. 10, p. 3472-6, Nov 2006.

PARK, I. K.; QIAN, D.; KIEL, M. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. **Nature**, London: v. 423, p. 302-5, May 2003.

PASSAMONTI, F. et al. Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders. **Haematologica**, Pavia: v. 88, p. 1123-29, Oct 2003.

PASSAMONTI, F. et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Am J Med**, New York: v. 117, n. 10, p. 755-61, Nov 2004.

PASSAMONTI, F. et al. A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis. **Blood**, London: v. 111, p. 3383-87, Apr 2008.

PASSAMONTI, F.; RUMI, E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. **Haematologica**, Pavia: v. 94, p. 7-10, Jan 2009.

PEARL-YAFE, M. et al. Expression of Fas and Fas-ligand in donor hematopoietic stem and progenitor cells is dissociated from the sensitivity to apoptosis. **Exp Hematol**, Copenhagen: v. 35, p. 1601-12, Oct 2007.

PIKMAN, Y. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLoS Med**, San Francisco: v. 3, p. 683-87, Jul. 2006.

PORCU, P.; NEIMAN, R. S.; ORAZI, A. Splenectomy in agnogenic myeloid metaplasia. **Blood**, New York: v. 93, p. 2132-34, Mar 1999.

PRCHAL, J. T. Polycythemia vera and other primary polycythemias. **Curr. Opin. Hematol.**, Philadelphia: v. 12, p. 112-116, Mar 2005.

RAFFI, S.; LIDEN, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. **Nat Med**, New York: v. 9, p. 702-12, Jun 2003.

REED, J. C.; PELLECCIA, M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. **Blood**, New York: v. 106, p. 408- 18, Jul 2005.

REEDER, T. L. et al. Both b and t lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Blood**, New York: v. 101, p. 1981-83, Mar 2003.

REILLY, J.T. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis to treatment. **Hematol Oncol**, New York: v. 24, p. 56-63, Feb 2006.

ROTHSTEIN, T. L. et al. Receptor-specific regulation of B-cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis and a novel Fas apoptosis inhibitory molecule. **Immunol Rev**, Copenhagen: v. 176, p. 166-233, Aug 2000.

RUUTU, T.; PARTANEN, S.; KNUUTILA, S. Clonal karyotype abnormalities in erythroid and granulocyte-monocyte precursors in polycythaemia vera and myelofibrosis. **Scand J Haematol**, Copenhagen: v. 31, p. 253-56, Sep 1983.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, Basingstoke: v. 23, p. 2861-74, Apr. 2004.

SALIM, J. P. et al. Dysregulation of stromal derived factor 1/CXCR4 axis in the megakaryocytic lineage in essential thrombocythemia. **Br J Haematol**, Oxford: v. 144, p. 69-77, Jan 2009.

SALVESEN, G. S.; RENATUS, M. Apoptosome: the seven-spoked death machine. **Dev Cell**, Cambridge: v. 2, p. 256-57, Mar 2002.

SANLIOGLU, A. D. et al. TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, Elmsford: v. 69, p. 716-23, Nov 2007.

SANTOS, F. P.; VERSTOVSEK, S. JAK2 inhibitors: what's the true therapeutic potential? **Blood Rev**, London: v. 25, n. 2, p. 53-63, Mar 2011.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, London: v. 407, p. 784-88, Oct. 2000.

SCHENEIDER, T. J. et al. A novel gene coding for a Fas apoptosis Inhibitory Molecule (FAIM) isolated from Inducibly Fas-resistant B lymphocytes. **J Exp Med**, New York: v. 189, p. 949-56, Mar 1999.

SCHMITT, A. et al. Polymorphonuclear neutrophil and megacariocyte mutual involvement in myelofibrosis pathogenesis. **Leuk lymphoma**, London: v. 43, p. 719-24, Apr 2002.

SCOTT, L. M. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. **N Engl J Med**, Boston: v. 356, p. 459-68, Feb 2007.

SEGURA, M. F. et al. The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis. **J Neurosci**, Washington: v. 27, p. 11228-41, Oct 2007.

SEPÚLVEDA, P. et al. BCL-2 expression is mainly regulated by JAK/STAT3 pathway in human CD34⁺ hematopoietic cells. **Cell Death Differ**, London: v.14, p. 378-80, Feb 2007.

SIRHAN, S. et al. The presence of JAK2V617F in primary myelofibrosis or its allele burden in polycythemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. **Am J Hematol**, New York: v. 83, p.363-365, May 2008.

SKOMMER, J.; WLODKOWIC, D.; DEPTALA, A. Larger than life: mitochondria and Bcl-2 family. **Leuk Res**, New York: v. 31, p. 277-86, Mar 2007.

SOLBERG, L. A. et al. The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis. **Br J Haematol**, Oxford: v. 99, n. 1, p. 174-80, Oct 1997.

SOLE, C. et al. The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kappa B signaling. **J Cell Biol**, New York: v. 167, p. 479-92, Nov 2004.

SONOKI, T. et al. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, London: v. 19, p. 2009-10, Nov 2005.

SPELETAS, M. et al. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. **Leuk Res**, New York: v. 31, p.:1053-62, Oct 2007.

SPIVAK, J. L. Polycythemia vera: myths, mechanisms and management. **Blood**, New York: v. 100, p. 4272–4290, Dec 2002.

STEENSMA, D. P. et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. **Blood**, New York: v. 106, p. 1207-09, Apr 2005.

STEURER, M.; ZOLLER, H.; AUGUSTIN, F. et al. Increased angiogenesis in chronic idiopathic myelofibrosis: vascular endothelial growth factor as a prominent angiogenic factor. **Hum Pathol**, Philadelphia: v. 38, p. 1057-64, Apr 2007.

SWERDLOW, S. H. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. Lyon, France: IARC; 2008.

TABAK, D. G: Quimioterapia e Radioterapia. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hematologia: Fundamentos e Prática. 1ª Edição, Ed Atheneu: São Paulo, 2001, 403-12.

TAMM, I.; KORNBLAU, S. M.; SEGALL, H. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. **Clin Cancer Res**, Denvile: v. 6, p. 1796-803, May 2000.

TEFFERI, A. et al. Clinical and bone marrow effects of interferon alfa therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Blood** London: v. 97, p. 1896, Mar 2001.

TEFFERI, A.; MURPHY, S. Current opinion in essential thrombocythemia: pathogenesis, diagnosis, and management. **Blood**, London: v. 15, p. 121-31, Sep 2001.

TEFFERI, A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. **J Clin Oncol**, New York: v. 23, p. 8520-30, Nov 2005.

TEFFERI, A. et al. Lenalidomide therapy in del(5)(q31)- associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. **Leukemia**, London: v. 21, p. 1827–28, Aug 2007.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasm: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia**, London: v. 22, p. 14-22, Jan 2008.

TEFFERI, A. Molecular drug targets in myeloproliferative neoplasms: mutant ABL1, JAK2, MPL, KIT, PDGFRA, PDGFRB and FGFR1. **J Cell Mol Med**, London: v. 13, p. 215-37, Feb 2009a.

TEFFERI, A.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.W. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. **Cancer**, New York: May 2009b.

TEFFERI, A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. **Leukemia**, London: v. 24, n. 6, p. 1128-38, Jun 2010.

TEFFERI, A.; VAINCHENKER, W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. **J Clin Oncol**, New York: v. 29, p. 573-82, Feb 2011.

TEFFERI, A. Annual Clinical Updates in Hematological Malignancies: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol**, New York: v. 86, n. 3, p. 292-301, Mar 2011.

TEMERINAC, S. et al. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. **Blood**, London: v. 95, p. 2569–76, Apr 2000.

THEOPHILE, K. et al. Expression profiling of apoptosis-related genes in megakaryocytes: BNIP3 is downregulated in primary myelofibrosis. **Exp Hematol**, Copenhagen: v. 36, p. 1728-38, Dec 2008.

THEPOT, S. et al. Treatment of progression of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms to myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia by azacitidine: a report on

54 cases on the behalf of the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). **Blood**, London: v. 116, n. 19, p. 3735-42, Nov 2010.

THIELE, J. et al. Splenic haematopoiesis in primary (idiopathic) osteomyelofibrosis: immunohistochemical and morphometric evaluation of proliferative activity of eritro- and endoreduplicative capacity of megakaryopoiesis (PCNA- and Ki-67 staining). **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, Berlin: v. 64, p. 281-86, 1993.

THOMADAKI, H.; SCORILAS, A. Bcl-2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. **Crit Rev Clin Lab Sci**, Philadelphia: v. 43, p. 61-67, Jan 2006.

VAINCHENKER, W.; DELHOMMEAU, F.; VILLEVAL, J.L. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative diseases. EHA p. 239-246, 2007 **Hematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association**, London: v.1, p. 239-46, 2007.

VAN ETEN, R. A. et al. The Ph-positive and Ph-negative myeloproliferative neoplasms: some topical pre-clinical and clinical issues. **Haematologica**, Pavia: v. 96, p.590-601; Jan 2011

VAN ETEN, R. A.; SHANNON, K.M. Focus on myeloproliferative diseases a myelodysplastic syndromes. **Cancer Cell**, Cambridge: v. 6, p. 547–552, Dec 2004.

VANNUCCHI, A. M. et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. **Blood**, London: v. 110, p. 840-46, Aug 2007a.

VANNUCCHI, A. M. et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. **Leukemia**, London: v. 21, p. 1952-59, Sep 2007b.

VANNUCCHI, A. M.; GUGLIELMELLI, P.; TEFFERI, A. Advances in Understanding and management of Myeloproliferative Neoplasms. **CA Cancer J Clin**, New York: v. 59, p. 171-91, May-Jun 2009.

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm. **Blood**, New York: v. 100, p. 2292–2302, Oct 2002.

VENTURINI, L.; BATTMER, K.; CASTOLDI, M. et al. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34⁺cells. **Blood**. London: v. 109, p. 4399-405, May 2007.

VERSTOVSEK, S. Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 636-42, 2009.

VERSTOVSEK, S. et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. **N Engl J Med**, Boston: v. 363, n. 12, p. 1117-27, Sep 2010.

VUCIC, D.; FAIRBROTHER, W.J. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. **Clin Cancer Res**, Denville: v. 13, p. 5995-6000, Oct 2007.

WAJANT, H. et al. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). **J Biol Chem**, São Francisco: v. 275, p. 24357-66, Aug 2000.

WAJANT, H. TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. **Vitam Horm**, New York: v. 67, p. 101-32, 2004.

WALCZAK, H. et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. **Nat Med**, New York: v. 5, p. 157-63, Feb 1999.

WANG, J.C. et al. Quantitative analysis of growth factor production in the mechanism of fibrosis in agnogenic myeloid metaplasia. **Exp Hematol**, Copenhagen: v. 34, p. 1617-23, Dec 2006.

WANG, M.J. LIU S, LIU Y, ZENG D. Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Neurosci Res**, New York: n. 59, p. 40-6, May 2007.

WANG, X. et al. Akt-mediated eminent expression of c-FLIP and Mcl-1 confers acquired resistance to TRAIL-induced cytotoxicity to lung cancer cells. **Mol Cancer Ther**, Philadelphia: v. 7; p. 1156-63, May 2008.

WEINKOVE, R. et al. Low-dose thalidomide in myelofibrosis. **Haematologica**, v. 93, n. 7, p. 1100-1, Jul 2008.

WERNIG, G. et al. Efficacy of TG101348 a selective JAK2 inhibitor in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. **Cancer Cell**, Cambridge: v. 13, p. 311-320, Apr 2008.

WILKINS, B. S. et al. Extramedullary haemopoiesis in fetal and adult human spleen: a quantitative immunohistological study. **Histopathology**, Oxford: v. 24, p. 241-47, Mar 1994.

WOLANSKYJ, A. P. et al. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. **Mayo Clin Proc**, Rochester: v. 81, p. 159–166, Feb 2006.

WOLF, B.C.; NEIMAN, R. S. Myelofibrosis with myeloid Metaplasia: pathophysiologic implications of the correlation between bone marrow changes and progression of splenomegaly. **Blood**, New York: v. 65, p. 803-9, Apr 1985.

WUILLEME-TOUMI, S. et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. **Leukemia**, London: v. 19, p. 1248-52, Jul 2005.

XU, M. et al. Constitutive mobilization of CD34⁺ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. **Blood**, New York : v. 105, p. 4508-15, Jun 2005.

YANG, J. et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, Washington: v. 275, p. 1129-32, Feb 1997.

ZEUNER, A. et al. Increased death receptor resistance and FLIPshort expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. **Blood**, New York: v. 107, p. 3495-3502, May 2006.

ZHAN, Q.; FAN, S.; BAE, I. et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. **Oncogene**, Basingstoke: v. 9, p. 3743–51, Dec 1994.

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

ZHAO, R. et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. **J Biol Chem**, San Francisco: v. 280, p. 22788-92, Apr 2005.

ZHOU, P. et al. Mcl-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. **Blood**, London: v. 92, p. 3226-391, Nov 1998.

APÊNDICES

Apêndice 1 .Quadro Resumo dos Resultados mais relevantes

		<i>EXPRESSÃO AUMENTADA</i>	<i>EXPRESSÃO DIMINUÍDA</i>	
Trombocitemia Essential	Células CD34 ⁺	<i>a1, mcl-1</i>		
		<i>bik, bok, noxa, bid</i>		
		<i>c-iap-1, c-iap-2</i>	<i>bax</i>	
		<i>fas, faim, dr4, c-flip</i>		
	Leucócitos	<i>a1, bcl-2, bcl-w, bcl-x_L</i>		
		<i>bad, bok</i>	<i>bid, bim_{EL}</i>	
		<i>c-iap-2</i>	<i>c-iap-1, XIAP, Survivina</i>	
		<i>dr4</i>	<i>fas-L, trail</i>	
		Células CD34 ⁺	<i>a1, bcl-w</i>	
			<i>bak, bok, noxa</i>	<i>bcl-2</i>
<i>c-iap-1, c-iap-2</i>	<i>survivina</i>			
<i>fas, fas-L, faim, c-flip</i>				
Mielofibrose	Leucócitos	<i>bcl-2, bcl-w, bcl-x_L</i>	<i>XIAP</i>	
		<i>bad, bok</i>	<i>fas-L, trail</i>	
		<i>c-iap-2</i>		
<i>microRNA (Leucócitos)</i>		miR26a, miR130b, let7d, miR198	miR16	

Continua

Conclusão

CORRELAÇÕES		
	Positiva	Negativa
%JAK2V617F	<i>dr4</i>	<i>a1, mcl-1,</i>
	<i>PRV-1</i>	<i>bad, bax, noxa, bid</i>
		<i>c-iap-2</i>
Contagem de PLT	<i>a1, mcl-1, bcl-x_L.</i>	<i>bim_{EL}, bok</i>
		<i>PRV-1</i>
		<i>bad</i>
Contagem de Leucócitos	<i>mcl-1</i>	<i>faim, c-flip</i>
	<i>%JAK2V617F</i>	<i>c-iap-2</i>
Aumento do Baço	<i>bcl-2, bcl-x_L.</i>	
	<i>c-iap-2, survivina</i>	
	<i>faim, c-flip</i>	<i>bax, bik</i>
	<i>PRV-1</i>	
Expressão <i>PRV-1</i>	<i>a1, bcl-w</i>	<i>bik, bax</i>
	<i>c-iap-2</i>	<i>trail</i>
Porcentagem de Apoptose	<i>Bad, bid, , bim_{EL},</i>	<i>a1, mcl-1</i>
	<i>bik, noxa</i>	<i>faim</i>
		<i>PRV-1</i>
	<i>trail, fas-L, dr4</i>	
		<i>Survivina</i>

Apêndice 2. Manuscrito publicado no “*Journal of Clinical Pathology*”

Downloaded from jcp.bmj.com on December 15, 2010 - Published by group.bmj.com

Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in chronic myeloproliferative diseases

Raquel Tognon, Elainy Patrícia Lino Gasparotto, Janine Marie Gisele Leroy, et al.

J Clin Pathol 2011 64: 75-82 originally published online November 2, 2010
doi: 10.1136/jcp.2010.080895

Updated information and services can be found at:

<http://jcp.bmj.com/content/64/1/75.full.html>

These include:

References

This article cites 62 articles, 25 of which can be accessed free at:

<http://jcp.bmj.com/content/64/1/75.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/ep>

Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in chronic myeloproliferative diseases

Raquel Tognon,¹ Elaine Patrícia Lino Gasparotto,¹ Janine Marie Gisele Leroy,² Gislane Lelis Vilela Oliveira,¹ Renata Peres Neves,¹ Rita de Cássia Viú Carrara,³ Simone Kashima,³ Dimas Tadeu Covas,³ Mary Santana,⁴ Elizabeth Xisto Souto,⁴ Maria Aparecida Zanichelli,^{4,7} Carlos Eduardo Engel Velano,⁵ Belinda Pinto Simões,⁵ Fernando Lopes Alberto,⁶ Kozue Miyashiro,⁶ Ana Maria de Souza,¹ Gustavo Pessini Amarante-Mendes,² Fabíola Attié de Castro¹

► Additional tables and figures are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://jcp.bmj.com>).

¹Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, Brazil. INCT-IF

²Department of Immunology, University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo, Brazil

³Ribeirão Preto Center for Transfusion Medicine, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Medicine, Ribeirão Preto, Brazil

⁴Brigadeiro Hospital of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵Department of Clinical Medicine, University of São Paulo at Ribeirão Preto School of Medicine, Ribeirão Preto, Brazil

⁶Leury Medicine and Health, São Paulo, Brazil

⁷Institute for cancer treatment in children-ITACI

Correspondence to Professor Fabíola Attié de Castro, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto — USP, Laboratório de Hematologia, Av do Café, s/n Ribeirão Preto, SP, Brazil CEP: 14040-903; castrofa@fcfrp.usp.br

Accepted 28 September 2010
Published Online First
2 November 2010

ABSTRACT

Background Chronic myeloproliferative disorders (MPDs) are clonal haematopoietic stem cell malignancies characterised by an accumulation of mature myeloid cells in bone marrow and peripheral blood. Deregulation of the apoptotic machinery may be associated with MPD physiopathology.

Aims To evaluate expression of death receptors' family members, mononuclear cell apoptosis resistance, and JAK2 allele burden.

Subjects and Methods Bone marrow haematopoietic progenitor CD34 cells were separated using the Ficoll-hypaque protocol followed by the Miltenyi CD34 isolation kit, and peripheral blood leukocytes were separated by the Haes-Steril method. Total RNA was extracted by the Trizol method, the High Capacity Kit was used to synthesise cDNA, and real-time PCR was performed using SybrGreen in ABIPrism 7500 equipment. The results of gene expression quantification are given as $2^{-\Delta\Delta C_t}$. The JAK2 V617F mutation was detected by real-time allelic discrimination PCR assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by the Ficoll-hypaque protocol and cultured in the presence of apoptosis inducers.

Results In CD34 cells, there was mRNA overexpression for *fas*, *faim* and *c-flip* in polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF), as well as *fasl* in PMF, and *dr4* levels were increased in ET. In leukocytes, *fas*, *c-flip* and *trail* levels were increased in PV, and *dr5* expression was decreased in ET. There was an association between *dr5* and *fasl* expression and JAK2V617F mutation. PBMCs from patients with PV, ET or PMF showed resistance to apoptosis inducers.

Conclusions The results indicate deregulation of apoptosis gene expression, which may be associated with MPD pathogenesis leading to accumulation of myeloid cells in MPDs.

INTRODUCTION

Myeloproliferative disorders (MPDs) are clonal haematopoietic stem cell malignancies characterised primarily by hypercellular bone marrow, proliferation of cells from one or several myeloid lineages, and haematopoietic progenitor independence of, or hypersensitivity to, cytokines.^{1–3}

According to the World Health Organization (WHO), myeloproliferative neoplasms can be divided into two groups: classic MPDs, comprising chronic myelogenous leukaemia (CML), polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF); and less common MPDs, such as chronic neutrophilic leukaemia.⁴

MPDs are heterogeneous in their molecular aspects and natural course, but their physiopathology often involves deregulation of tyrosine kinases, such as that of Bcr-Abl in the pathogenesis of CML.^{1,5}

In 2005, several independent groups reported in patients with MPD a somatic mutation in the Janus kinase JAK2, which has a key role in the signal transduction pathway of various haematopoietic growth factor receptors.^{2,6–9} The point mutation that led to valine-to-phenylalanine substitution at polypeptide position 617 is designated JAK2V617F and is responsible for constitutive kinase activity.^{10–14}

JAK2V617F mutation has been reported in approximately half of all patients with PMF and ET and in nearly all of those with PV.^{2,6–8,15–17} Increased JAK2V617F allele burden has been associated with upregulated expression of downstream JAK2 target genes, such as polycythaemia rubra vera 1 (PRV-1).^{6,16,17} There are also indications that patient mutation status correlates with prognosis and treatment response.^{18–21}

Regardless of the recent advances in MPD diagnosis and description of molecular markers, clearer reports of the mechanisms involved in the physiopathology of MPDs are needed to identify new markers of diagnostic and prognostic molecular targets for therapy. In this context, we can hypothesise that deregulation of apoptosis contributes to the myeloaccumulation seen in these disorders, since there is a constant need to control the numbers of haematopoietic cells because of the great potential for intrinsic proliferation and cell turnover.^{22–24} The literature data reinforce our hypothesis, since deregulation of the apoptosis process has been reported in various myeloid haematological neoplasias such as chronic neutrophilic leukaemia,²⁵ myelodysplastic syndromes,²⁶

Original article

CML²⁷ and in MPD chromosome Ph negative.^{28–29} In myelodysplastic syndromes, it has been described as an altered expression of genes related to the intrinsic apoptosis pathway.²⁶ In CML, the cells are resistant to apoptosis due to the kinase Bcr-Abl, and overexpression of anti-apoptotic genes has been described.²⁷ In MPD chromosome Ph negative, little is known about apoptosis-related gene expression. Zeuner *et al*²⁸ in PV found *c-flip* overexpression, and Ciurea *et al*²⁹ described a different development of megakaryocyte apoptosis and overexpression of anti-apoptotic protein Bcl-x_L in PMF. Laubach and collaborators³⁰ reported that PV-deregulated erythropoiesis is linked to erythropoietin hypersensitivity and apoptosis resistance of erythroid precursor cells.

Taken together, all this information from the literature indicates that, in most cases, apoptosis deregulation is associated with haematological neoplasia pathogenesis.^{25–31}

Two major apoptotic pathways have been well characterised: one is activated by changes in mitochondrial permeability (intrinsic pathway); the other is triggered by cell surface death receptors engaging their specific ligands (extrinsic pathway).³² Activation of the death receptor pathway, which primarily includes CD95 (APO-1/Fas) or TRAIL receptors (DR4 and DR5) and their ligands (FasL and TRAIL, respectively), likewise the anti-apoptotic molecules FAIM and C-FLIP, results in recruitment of adaptor molecules and caspase-8 to form the death-inducing signalling complex, thereby inducing caspase-3 activation and apoptosis.^{24–33}

The aim of this study was to quantify expression of the genes *fas*, *fasl*, *faim*, *c-flip*, *dr4*, *dr5* and *trail*, all of which participate in mechanisms that regulate the extrinsic pathway, in CD34 cells and leukocytes from patients with MPDs. We also attempted to detect mononuclear cell susceptibility to death stimulated by apoptosis inducers and to correlate the results with JAK2V617F allele burden.

SUBJECTS AND METHODS

Patients and controls

In this study, bone marrow and peripheral blood samples from 26 patients with ET, 12 with PV, and 11 with PMF were evaluated. There were 17 men and 32 women, mean age was 61.1 years (range, 35–83), and 45 patients were white and six were black (online supplementary table 1). All of the patients selected had been diagnosed according to WHO criteria.⁴ The controls comprised bone marrow samples collected from 23 healthy subjects (12 male, 11 female; mean age 35.9 years (range 14–54)) and peripheral blood samples from 30 subjects (11 male, 19 female; mean age 54.5 years (range 31–80)). Patients were selected from those treated at the Brigadeiro Hospital as well as from the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo at Ribeirão Preto School of Medicine, state of São Paulo, Brazil. Healthy subjects were recruited from the University of São Paulo at Ribeirão Preto School of Pharmaceutical Sciences, whereas those who provided bone marrow samples were recruited from among marrow donors at the Bone Marrow Transplantation Unit of the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo. There is a significant age difference between bone marrow controls and the patient population because the local ethics committees would only permit bone marrow samples to be obtained from bone marrow donors during the bone marrow transplantation cell collection procedure.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and leukocytes

PBMCs were isolated using the Ficoll-hypaque density gradient protocol (Histopaque; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA)

according to the manufacturer's instructions. The PBMCs isolated were used to assess lymphocyte apoptosis assays.

Leukocytes were obtained from the peripheral blood of patients and controls using Haes-Steril reagent (Volvuven; Frasenius Kabi, Campinas, Brazil).

CD34 haematopoietic stem cell separation

Haematopoietic progenitor CD34 cells collected from patients and controls were separated from bone marrow mononuclear cells using the MidiMac CD34⁺ Isolation Kit (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's protocol. CD34 purity was determined by flow cytometry (FACSsort; Becton Dickinson, San Jose, California, USA). CD34 cells with ≥80% purity were used in the detection of gene expression by quantitative real-time PCR.

Total RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR

Total RNA was extracted from leukocytes and CD34 cells using Trizol methods (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA) as described by the manufacturer. RNA concentration and purity was determined spectrophotometrically by measuring fluorescence at 260 nm and 280 nm. RNA (1 µg) was reverse-transcribed to cDNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), also according to the manufacturer's instructions. cDNA (1 µl of cDNA diluted 1:3) was applied in the real-time PCR assay to determine the expression of *c-flip*, *dr4*, *dr5*, *fas*, *fasl*, *faim* and *trail*. Gene expression was quantified using the SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) and specific primers (Invitrogen Life Technologies) (online supplementary table 2) on the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Real-time PCR conditions were: 50°C for 2 min; 95°C for 10 min; and 50 cycles at 95°C for 15 s; 54 at 60°C (specific for target gene) for 25 s; and 72°C for 34 s. The annealing temperatures of each set of primers are also shown in supplementary table 1. *β-actin* and *GAPDH* genes were used as endogenous controls (housekeeping genes). The amount of mRNA for each sample was normalised using the geometric average of the housekeeping genes. All reactions were duplicated, and the relative expression levels were calculated using the 2^{−ΔΔCt} method³⁴ with the mean of the control group used as calibrator.

Detection of JAK2V617F mutation and determination of JAK2V617 allele burden

The JAK2V617F mutation was detected in a reference laboratory (Fleury Medicine and Health, São Paulo, SP, Brazil) by real-time allelic discrimination PCR assay. The assay used two fluorogenic, minor groove binding probes to detect the G→T mutation in exon 14 of JAK2 gene. Sequences of primers (forward primer, 5'-GCAGCAAGTATGATGAGCAAGCT-3'; reverse primer, 5'-GGCATTAGAAAGCCTGTAGTTTACTTAC-3') and minor groove binding probes were designed by using Primer Express software, version 1.5 (Applied Biosystems). The hybridisation probes were designed with different dyes to allow single-tube allelic discrimination. One probe with the reporter FAM (6-carboxyfluorescein) was targeted to the wild-type allele (5'-6-FAM-TGGAGTATGTGTCTGTGGA-3') and the other probe with the reporter VIC (6-carboxyrhodamine 6G) was targeted to the mutant allele (5'-VIC-TGGAGTATGTTTCTGTGGAG-3'). Primers were synthesised by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) and probes were synthesised by Applied Biosystems. Amplification by real-time PCR was performed using TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). Thermal cycling conditions consisted of 50°C for 2 min, 45

Original article

cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min on the Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Each PCR assay included a control without added DNA (no-template control).

The allele burden was estimated based on the normalised fluorescent signal of the mutant allele and wild-type allele of real-time PCR and reported as a percentage of JAK2V617F mutation or negative.

Assessment of mononuclear cell apoptosis

Mononuclear cells were cultured in complete RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10 mM Hepes, 200 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ for 12 h in the presence of apoptosis inducers: actinomycin (ACT-D, 1 µM; Sigma); etoposide (VP16, 25 µM; Bristol-Meyers-Squibb, Mayaguez, Puerto Rico); teniposide (VM26, 25 µM; Bristol-Meyers-Squibb); cytarabine (ARA-C, 25 µM; Pfizer, Milano, Italy); staurosporine (STS, 0.5 µM; Sigma-Aldrich).

Cell apoptosis was quantified by flow cytometry, using the annexin-V/fluorescein isothiocyanate (FITC) technique. Mononuclear cells were recovered from culture medium by centrifugation at 240 × g for 10 min at 4°C, washed once with annexin buffer (10 mM Hepes, pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 1.8 mM CaCl₂) and incubated for 20 min in the dark with 100 µl annexin-V/FITC. Subsequently, 40 µl propidium iodide (PI) solution (50 µg/ml) was added to each tube, and the contents were analysed by flow cytometry. Five thousand mononuclear cells were acquired using a FACS Canto Flow Cytometer (Becton-Dickinson) and analysed by dot-plot using Diva 6.0 Software (Becton-Dickinson). The results are given as a percentage of the apoptotic cells (mononuclear cells positive for annexin-V and PI negative staining). A representative FACS plot of annexin/PI staining showing the full gating strategy on mononuclear cells (forward scatter and side scatter gate) and the dot-plot analysis of negative control and mononuclear cells stimulated by teniposide (VM26) are shown in figure 1A–C.

Although it is controversial, many authors^{35–38} have reported lymphoid lineage involvement in PV, ET and PMF. Thus, we chose mononuclear cells to perform the assays of apoptosis measurement because the mononuclear cell isolation protocol produces a cell population with high purity, and FACS analysis well

discriminates between lymphocytes and monocytes stimulated by apoptotic inducers.

Statistical analysis

Data related to gene expression and percentages of apoptotic cells from patients and controls were compared by the non-parametric Mann–Whitney test. To draw correlations between JAK2V617F allele burden and gene expression, we used the non-parametric Spearman test. Statistical analyses were carried out using Prism Software V5.0. $p \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

fas, *fasl*, *dr4*, *faim* and *c-flip* expression is elevated in CD34 cells from patients with MPDs

As can be seen in figure 2A, *fas* expression was significantly higher in the PV, ET and PMF groups than in the control group ($p < 0.0001$, $p = 0.0013$ and $p = 0.0004$, respectively), and there was significant difference between the control group and PMF group in terms of CD34 *fasl* mRNA levels ($p = 0.0002$, figure 2B). The levels of *trail* and *dr5* in CD34 cells were comparable between patients and controls ($p > 0.05$) (online supplementary figure 1A,B). In contrast, *dr4* expression was increased in the ET group ($p = 0.0079$; figure 2C).

Expression of the anti-apoptotic gene *faim* was also elevated in the three groups in comparison with the control group ($p = 0.0048$, $p = 0.0002$, $p = 0.0076$), as shown in figure 2D, and *c-flip* expression was also elevated in the PV, ET and PMF groups in comparison with the control group ($p = 0.0228$, $p = 0.0121$ and $p = 0.0026$, respectively; figure 2E).

Analysing gene expression among MPD groups, we found a significant difference between the ET and PMF groups in terms of *fasl* expression ($p = 0.0012$, figure 2B).

It is worth emphasising here that there is no difference in apoptosis-related gene expression ($p > 0.05$) with age (range 14–54 years, median 37.0) within the normal population (bone marrow donors) (data not shown).

Expression of *fas*, *trail*, *dr5*, *c-flip* and *faim* is deregulated in leukocytes of patients with MPDs

Expression of *fas* was higher in the PV group than in the control group ($p = 0.0013$; figure 3A), and *fasl* expression was not

Figure 1 (A) Dot-plot diagram of gate in control mononuclear cells; (B) dot-plot diagram of fluorescein isothiocyanate (FITC)/annexin-V/propidium iodide (PI) flow cytometry of control mononuclear cells without treatment; (C) dot-plot diagram of FITC/annexin-V/PI flow cytometry of control mononuclear cells treated with 25 µM teniposide. In (B) and (C), the lower right quadrants show the viable cells, which exclude PI and are negative for FITC/annexin-V binding. The upper right quadrants contain the non-viable cells, necrotic cells, positive for FITC/annexin binding and for PI uptake. The lower right quadrants represent apoptotic cells, FITC/annexin-V positive and PI negative. FSC: Forward scatter; SSC: side scatter; FL1: fluorescence channel 1; FL3: fluorescence channel 3.

Original article

Figure 2 Gene expression in bone marrow CD34 cells of control, polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) groups: (A) *fas* (median: control, 1.80; PV, 13.16; ET, 5.52; PMF, 7.21); (B) *fasl* (median: control, 1.13; PV, 11.16; ET, 4.46; PMF, 213.1); (C) *dr4* (median: control, 1.54; PV, 2.49; ET, 5.20; PMF, 8.43); (D) *faim* (median: control, 0.82; PV, 12.95; ET, 26.03; PMF, 23.56); (E) *c-flip* (median: control, 0.78; PV, 7.22; ET, 1.93; PMF, 8.37). All differences are $p > 0.05$ unless otherwise noted.

significantly different between MPD groups and the control group ($p > 0.05$) (online supplementary figure 1C). In addition, we found that *trail* mRNA concentration was higher in PV leukocytes than control group leukocytes ($p = 0.0321$, figure 3B), and *dr5* expression was lower in ET leukocytes ($p = 0.0387$, figure 3C). *dr4* expression

was not significantly different between MPD groups and the control group ($p > 0.05$) (online supplementary figure 1D).

Expression of the anti-apoptotic genes *faim* and *c-flip* was increased in the PMF ($p = 0.0040$) and PV ($p = 0.0043$) group, respectively (figure 3D,E).

Figure 3 Gene expression in peripheral leukocytes of control, polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) groups: (A) *fas* (median: control, 0.60; PV, 4.38; ET, 0.51; PMF, 1.11); (B) *trail* (median: control, 1.024; PV, 2.25; ET, 0.67; PMF, 0.89); (C) *dr5* (median: control, 0.92; PV, 1.40; ET, 0.52; PMF, 0.77); (D) *faim* (median: control, 1.18; PV, 1.49; ET, 1.37; PMF, 2.05); (E) *c-flip* (median: control, 0.81; PV, 9.71; ET, 1.32; PMF, 3.97). All differences are $p > 0.05$ unless otherwise noted.

Original article

Figure 4 Correlation of (A) *fasl* and (B) *dr5* expression in polycythaemia vera (PV) patients with the JAK2V617F allele burden.

Analysing MPD leucocyte gene expression, we found a significant difference between PV and ET groups in terms of *fas* expression ($p<0.0001$, figure 3A) and *trail* ($p=0.0033$, figure 3B) and between PV and PMF groups in terms of *fas* and *trail* expression ($p=0.0053$ and $p=0.0123$, respectively, figure 3A,B). We also detected that *fas* expression was elevated in PMF patients in comparison to ET patients ($p=0.0326$, figure 3A).

Correlation between gene expression and JAK2V617F mutation

There was a correlation between the JAK2V617F allele burden and *fasl* expression ($r=-0.5053$; $p=0.0469$; 95% CI=-0.8423 to 0.1159) in CD34 and between JAK2V617F allele burden and *dr5* expression ($r=0.6246$; $p=0.0150$; 95% CI=0.05985 to 0.8865) in leukocytes from PV patients (figure 4A,B, respectively).

There was no association between apoptosis-related gene expression and allele burden in ET and PMF patients. No differences were observed in level of apoptosis-related gene

expression between JAK2V617F positive and negative ET and PMF patients.

Mononuclear cells of MPD patients are resistant to apoptosis inducers

Mononuclear cell resistance to 1 μ M ACT-D and 25 μ M VP16 was higher in the PV ($p=0.03$, $p=0.03$, respectively), ET ($p<0.0001$, $z=0.01$, respectively) and PMF ($p<0.0001$, $p<0.0001$, respectively) groups than in the control group (figure 5A,B). Cells obtained from ET and PMF patients were more resistant to apoptosis induced by 25 μ M VM26 than were those obtained from controls ($p=0.005$ and $p=0.001$, respectively; figure 5C). In comparison with the values obtained for controls, the resistance of apoptotic cells to 25 μ M ARA-C was higher in PV, ET and PMF group cells ($p=0.031$, $p=0.033$ and $p=0.013$, respectively; figure 5D), as was that induced by 5 μ M STS in ET and PMF group cells ($p=0.0002$ and $p<0.0001$, respectively, figure 5E).

Figure 5 Percentage of mononuclear cell apoptosis induced by drugs and detected by annexin-V/fluorescein isothiocyanate (FITC) in control, polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) groups: (A) 1 μ M ACT-D (median: control, 35.10; PV, 25.50; ET, 13.00; PMF, 5.25); (B) 25 μ M VP16 (median: control, 21.41; PV, 12.25; ET, 15.70; PMF, 4.90); (C) 25 μ M VM26 (median: control, 26.80; PV, 21.00; ET, 19.60; PMF, 7.70); (D) 25 μ M ARA-C (median: control, 9.10; PV, 5.40; ET, 6.35; PMF, 1.90); (E) 0.5 μ M STS (median: control, 36.05; PV, 30.35; ET, 15.80; PMF, 5.50). All differences are $p>0.05$ unless otherwise noted. The box and whisker graphs show the maximum, median and minimum of the mononuclear cell apoptosis percentage.

Original article

Among MPD groups, we detected a difference in mononuclear cell susceptibility to: 1 μ M ACT comparing PV and ET groups ($p=0.004$), PV and PMF groups ($p=0.002$) and ET and PMF groups ($p=0.05$) (figure 5A); 25 μ M VP16 between PV and PMF groups ($p=0.014$) and between ET and PMF groups ($p=0.004$) (figure 5B); 25 μ M VM26 comparing PV and PMF groups ($p=0.007$) and comparing ET and PMF groups ($p=0.047$) (figure 5C); and 0.5 μ M STS between PV and ET groups ($p=0.002$), between PV and PMF groups ($p=0.0009$) and between ET and PMF groups ($p=0.022$) (figure 5E).

DISCUSSION

MPDs are characterised by increased numbers of myeloid cells, a lineage that typically predominates. The mechanisms whereby myeloproliferation, disease progression and development occur in MPDs remain unknown. Abnormal expression of apoptosis regulatory genes has been described in oncological and haematological diseases, and associations between regulatory gene expression and the pathogenesis of such diseases have been demonstrated.^{26 28 39}

Thus, we investigated here the expression of the genes *fas*, *fasl*, *faim*, *c-flip*, *dr4*, *dr5* and *trail* in CD34 haematopoietic stem cells and leukocytes from patients with MPDs. We detected a potential correlation between apoptosis-related gene expression with JAK2V617F mutation and mononuclear cell apoptosis.

It is noteworthy that we found alterations in Fas system-related gene expression in CD34 cells and leukocytes from patients with MPDs. It is well known that the Fas/FasL system is critically involved in haematopoietic cell survival and apoptosis.^{24 33 40} Under physiological conditions, CD34 bone marrow cells express Fas at lower levels; during haematopoietic cell differentiation, the receptor is expressed in proliferating and differentiating progenitors, serving as a negative regulator of distal differentiation in all lineages.^{41–43} FAIM, the expression of which is also deregulated in MPD patients evaluated here, is a Fas antagonist that has been reported to be upregulated in resistant B cells and functions as an inhibitor of Fas-induced cell death. FAIM is highly conserved in evolution and is broadly expressed in many tissues.^{44–47}

Regarding *c-flip* expression, our data corroborate data in the literature on PV and ET.^{28 48} Zeuner *et al*²⁸ showed an increase in FLIPshort expression in PV erythroid precursor cells. These authors found that JAK2V617F mutation in PV erythroblasts obtained in vitro was associated with cytokine-independent activation of the ERK/MAPK and PI3K pathways and deregulated expression of *c-flip*. They also showed that one patient in three with wild-type JAK2 was resistant to death receptor activation and had extremely high levels of *c-flip*, indicating that *c-flip* overexpression may also contribute to death receptor resistance in PV patients with wild-type JAK2.²⁸

Tenedini *et al*⁴⁸ described overexpression of *c-flip* in a global gene expression study of normal and malignant megakaryocytic cells from ET patients. They concluded that there is an imbalance between proliferation and apoptosis in malignant ET megakaryocytopoiesis.⁴⁸ We also evaluated the ligand TRAIL, a member of the tumour necrosis factor superfamily of genes, and expression of its two death receptors, DR4 and DR5. The true physiological role of the TRAIL molecule remains unclear. However, various studies have shown that it is a potent inducer of apoptosis in a wide range of cancer cell lines, although not in many normal cells.^{30 49–51}

In the present study, we did not find any alteration in *trail* expression in CD34 cells, but it was increased in leukocytes from MPD patients. Deregulated expression of death receptors *dr4* and *dr5* in CD34 cells and leukocytes from ET was also observed. Despite the fact that there are few data on apoptotic gene expression in MPD patients, these findings are in agreement with our hypothesis that apoptosis is deregulated in Bcr-Abl-negative patients with MPD. Besides, these molecules may be used in the future as molecular markers or prognostic factors for these diseases, since *dr4* expression has been shown to correlate positively with tumour grade in patients with breast cancer who have invasive ductal carcinoma,⁵² and it has been shown that there is a significant association between high *dr5* expression and reduced overall survival.⁵³ Furthermore, TRAIL therapy has been used in the treatment of neoplasia, and resistance to this treatment due to mechanisms such as changes in the expression of the anti-apoptotic proteins *c-flip* and *mcl-1*⁵⁴ has been demonstrated.^{55 56}

Figure 6 Adaptation of extrinsic apoptosis pathway showing alterations in gene expression in CD34 cells and leukocytes from polycythaemia vera (PV; filled arrows), essential thrombocythaemia (ET; cross-hatched arrows) and primary myelofibrosis (PMF; discontinuous arrows). CASP, caspase.

Original article

It is well known that the clinical course is less favourable among JAK2V617F-positive patients, and a high percentage of JAK2V617F mutations have been found to be associated with proliferation of clonogenic progenitors independently of exogenous cytokine stimulation.⁵⁷ It has been speculated that constitutive activation of JAK2 correlates with changes in gene expression, since JAK2V617F activates the ERK/MAPK and PI3K pathways, as well as the STAT5 pathway, resulting in sustained phosphorylation of these molecules and cell growth in the absence of the appropriate stimulus.² This would also protect cells from death receptor-induced apoptosis through multiple mechanisms, including 'upmodulation' of *c-flip*.^{28, 58–60} Our results suggest a relation between this molecular abnormality and *fasl* and *dr5* expression in PV patients. However, as we analysed seven genes and three diseases in this study, and the significance of the correlation of JAK2V617F allele burden and *fasl* expression was weak, we cannot confirm that the deregulated expression of the apoptosis-related genes analysed in this study is linked to JAK2V617F mutation.

We also assessed mononuclear cell apoptosis in MPD patients by using apoptosis inducers. The results suggest that the mononuclear cells of MPD patients were resistant to most of the drugs used in the assay, whereas those of the control group were not. The apoptosis inducers used in this study had different mechanisms of action for activating the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. For example, ACT-D inhibits DNA synthesis, triggering the intrinsic pathway, and also decreases expression of the anti-apoptotic gene *c-flip*, as well as amplifying *fasl* and TRAIL-mediated apoptosis.⁶¹ The percentage of apoptosis was lowest in patients with PMF, indicating that the level of resistance was highest in those patients.

c-flip overexpression in MPDs may block the apoptosis process by inhibiting procaspase-8 activation at the death-inducing signalling complexes by blocking its processing. Inhibition of caspase-8 cleavage leads to impairment of the activation of downstream effector caspases, hampering propagation of the apoptotic signal. *faim* upregulation also contributes to cell resistance to apoptosis in MPDs, since this molecule is a mediator of Fas resistance. FAIM plays a role in modulating Fas-mediated apoptosis and may act by influencing expression of c-FLIP and regulating the physical binding of caspase-8 to Fas.⁶² Deregulation of *fasl*, *fas* and *dr4* expression in the MPD patients evaluated may have also interfered with cell sensitivity to apoptosis; however, *faim* and *c-flip* negatively regulated activation of apoptosis pathway downstream receptors.

Taken together, our results indicate that MPD results in deregulation of the expression of genes that regulate the extrinsic pathway of the apoptotic mechanism (figure 6). To our knowledge, this is the first study to simultaneously evaluate the

expression of these specific anti- and pro-apoptotic death receptor pathway genes in Philadelphia-negative MPD patients, associating the results with apoptosis function and JAK2 allele burden. The data obtained in this investigation support the idea that deregulation of apoptosis may contribute, at least in part, to MPD pathogenesis.

The detection and monitoring of apoptosis-related gene expression as a biomarker may help in future identification of attractive candidates for new targeted monotherapies or combined therapies for MPD treatment.

Acknowledgements We thank Marcella Grando and Zita Gregório for their technical assistance and help in collecting peripheral blood samples. We are also grateful to Amélia Regina de Albuquerque for help with creating the figures, and Fabiana Rosseto de Moraes and Patrícia V. B. Palma for assistance with flow cytometry assays.

Funding RT is the recipient of a fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (No 08/54387-5). EPLG and RPN are recipients of fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and GLVO is the recipient of a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This work was supported by a FAPESP grant (No 06/50094-8).

Ethics approval This study was conducted with the approval of the Brigadoiro Hospital and Hospital das Clínicas of the University of São Paulo at Ribeirão Preto School of Medicine ethics committees (No 014/06 and No 10529/2006, respectively).

Contributors RT designed and performed experiments, analysed data and wrote the paper. EPLG, GLVO, JMG, RPN, RCV, AMS and SK performed some of the cell isolation and RNA extraction experiments. MAZ, EXS, DTC, CEEV, BPS and MS selected and treated the patients included in this study, as well as collecting the bone marrow samples for CD34+ cell isolation. MAZ, DTC, GPAM, AMS and SK discussed and revised the paper. FAC conceived the project, created the study design, analysed data, procured funding and wrote the paper.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Delhommeau F, Pisani D, James C, et al. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 2006;**63**:2939–53.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;**434**:1144–8.
- Spivak JL. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin Hematol* 2004;**41**(2 Suppl 3):1–5.
- Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;**22**:14–22.
- Reilly JT. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis to treatment. *Hematol Oncol* 2006;**24**:56–63.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;**352**:1779–90.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;**365**:1054–61.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;**7**:387–97.
- Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005;**280**:22788–92.
- Speletas M, Katodritou E, Daiou C, et al. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 2007;**31**:1053–62.
- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;**7**:673–83.
- Jones A, Kreil S, Zol K, et al. Widespread occurrence of JAK2-V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;**106**:2162–68.
- Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signalling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2004;**32**:179–87.
- Komura E, Chagraoui H, Mansat de Mas V, et al. Spontaneous STAT5 activation induces growth factor independence in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FKBP51 overexpression. *Exp Hematol* 2003;**31**:622–30.
- Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007;**110**:4030–6.
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006;**108**:1865–7.

Take-home messages

- ▶ In myeloproliferative diseases (MPDs) there is deregulation of expression of apoptosis-related genes from the extrinsic pathway (*fas*, *fasl*, *faim*, *c-flip*, *trail*, *dr4* and *dr5*).
- ▶ Deregulation of expression of apoptosis-related genes from the extrinsic pathway may contribute to the MPD pathogenesis, leading to cell apoptosis resistance.
- ▶ *fasl* and *dr5* expression correlate with JAK2V617F mutation in patients with polycythemia vera.

Original article

17. **Larsen TS**, Pallisgaard N, Møller MB, *et al*. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis-impact on disease phenotype. *Eur J Haematol* 2007;**79**:508–15.
18. **Campbell PJ**, Griesshammer M, Dohner K, *et al*. The V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006;**107**:2098–100.
19. **Sirhan S**, Lasho TL, Hanson CA, *et al*. The presence of JAK2V617F in primary myelofibrosis or its allele burden in polycythemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. *Am J Hematol* 2008;**83**:363–5.
20. **Kralovics R**, Buser AS, Teo SS, *et al*. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2003;**102**:1869–71.
21. **Mesa RA**, Tefferi A, Lasho TS, *et al*. Janus kinase 2 (V617F) mutation status, signal transducer and activator of transcription-3 phosphorylation and impaired neutrophil apoptosis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia* 2006;**20**:1800–8.
22. **Wickremasinghe RG**, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and haematological malignancies. *Blood* 1999;**93**:358–600.
23. **Schimmer AD**, Hedley DW, Penn LZ, *et al*. Receptor and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. *Blood* 2001;**98**:3541–53.
24. **Debatin KM**, Stahnke K, Fulda S. Apoptosis in haematological disorders. *Semin Cancer Biol* 2003;**13**:149–58.
25. **Hara K**, Abe Y, Hirase N, *et al*. Apoptosis resistance of mature neutrophils in a case of chronic neutrophilic leukaemia. *Eur J Haematol* 2001;**66**:70–1.
26. **Economopoulou C**, Pappa V, Kontsioti F, *et al*. Analysis of apoptosis regulatory genes expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res* 2008;**32**:61–9.
27. **Castro FA**, Jacysyn JF, Ulbrich AG, *et al*. Overexpression of the anti-apoptotic genes mcl-1, bcl-w, bcl-xl and a1 is correlated with to Chronic Myelogenous Leukemia progression and resistance to Gleevec [ASH Annual Meeting Abstract]. *Blood* 2005;**106**:P2880.
28. **Zeuner A**, Pedini F, Signore M, *et al*. Increased death receptor resistance and FLIP short expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood* 2006;**107**:3495–502.
29. **Ciurea SO**, Merchant D, Mahmud N. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007;**110**:986–93.
30. **Laubach JP**, Fu P, Jiang X, *et al*. Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Exp Hematol* 2009;**37**:1411–22.
31. **Deligezer U**, Delay N. Expression of the TRAIL Receptors in Blood Mononuclear Cells in leukemia. *Pathol Oncol Res* 2007;**13**:290–4.
32. **Jin Z**, El-Deiry W. Overview of cell death signalling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005;**4**:139–63.
33. **Krammer PH**. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;**407**:789–95.
34. **Pfaffl MW**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;**29**:e45.
35. **Ishii T**, Bruno E, Hoffman R, *et al*. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood* 2006;**108**:3128–34.
36. **Delhommeau F**, Dupont S, Tonetti C, *et al*. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007;**109**:71–7.
37. **Pardanani A**, Lasho TL, Finke C, *et al*. Extending Jak2V617F and MplW515 mutation analysis to single hematopoietic colonies and B and T lymphocytes. *Stern Cells* 2007;**25**:2358–62.
38. **Boğani C**, Guglielmelli P, Antonioli E, *et al*. B-, T-, and NK-cell lineage involvement in JAK2V617F-positive patients with idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* 2007;**92**:258–9.
39. **Contini P**, Zocchi MR, Pieri I, *et al*. In vivo apoptosis of CD8(+) lymphocytes in acute myeloid leukemia patients: involvement of soluble HLA-I and Fas ligand. *Leukemia* 2007;**21**:253–60.
40. **Bárcena A**, Park SW, Banapour B, *et al*. Expression of Fas/CD95 and Bcl-2 by primitive haematopoietic progenitors freshly isolated from human fetal liver. *Blood* 1996;**88**:2013–25.
41. **De Maria R**, Testa U, Luchetti L, *et al*. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 1999;**93**:796–803.
42. **Alenzi FQ**, Marley SB, Lewis JL, *et al*. A role for the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in regulating myeloid progenitor cell kinetics. *Exp Hematol* 2002;**30**:1428–35.
43. **Pearl-Yafe M**, Yölcü ES, Stein J, *et al*. Expression of Fas and Fas-ligand in donor haematopoietic stem and progenitor cells is dissociated from the sensitivity to apoptosis. *Exp Hematol* 2007;**35**:1601–12.
44. **Rothstein TL**, Zhong X, Schram BR, *et al*. Receptor-specific regulation of B-cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis and a novel Fas apoptosis inhibitory molecule. *Immunol Rev* 2000;**176**:116–33.
45. **Schneider TJ**, Fischer GM, Donohoe TJ, *et al*. A novel gene coding for a Fas apoptosis Inhibitory Molecule (FAIM) isolated from Inducible Fas-resistant B lymphocytes. *J Exp Med* 1999;**189**:949–56.
46. **Sole C**, Dolcet X, Segura MF, *et al*. The death receptor antagonist FAIM promotes neuritis outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kappa B signalling. *J Cell Biol* 2004;**167**:479–92.
47. **Segura MF**, Sole C, Pascual M, *et al*. The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis. *J Neurosci* 2007;**27**:11228–41.
48. **Tenedini E**, Fagioli ME, Vianelli N, *et al*. Gene expression profiling of normal and malignant CD34-derived megakaryocytic cells. *Blood* 2004;**104**:3126–35.
49. **Ashkenazi A**, Pai RC, Fong S, *et al*. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999;**104**:155–62.
50. **Walczak H**, Miller RE, Ariail K, *et al*. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999;**5**:157–63.
51. **LeBlanc HN**, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003;**10**:66–75.
52. **Sanfilippo AD**, Korum AF, Pestereli E, *et al*. TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;**69**:716–23.
53. **Cooper WA**, Kohonen-Corish MR, Zhuang L, *et al*. Role and prognostic significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptor DR5 in non-small-cell lung cancer and precursor lesions. *Cancer* 2008;**113**:135–42.
54. **Wang X**, Chen W, Zeng W, *et al*. Akt-mediated eminent expression of c-FLIP and Mcl-1 confers acquired resistance to TRAIL-induced cytotoxicity to lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008;**7**:1156–63.
55. **Han J**, Hou W, Goldstein LA. Involvement of protective autophagy in TRAIL-resistance of apoptosis defective tumor cells. *J Biol Chem* 2008;**283**:19665–77.
56. **Almasan A**, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signalling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;**14**:337–48.
57. **Passamonti F**, Rumi E, Pietra D, *et al*. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;**107**:3676–82.
58. **Wang W**, Prince CZ, Mou Y, *et al*. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation: resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;**277**:21723–9.
59. **Skurk C**, Maatz H, Kim HS, *et al*. The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a Controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J Biol Chem* 2004;**279**:1513–25.
60. **Starck L**, Scholz C, Dörken B, *et al*. Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-xL and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *Eur J Immunol* 2005;**35**:1257–66.
61. **Wang MJ**, Liu S, Liu Y, *et al*. Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Res* 2007;**59**:40–6.
62. **Huo J**, Xu S, Guo K, *et al*. Genetic deletion of faim reveals its role in modulating c-FLIP expression during CD95-mediated apoptosis of lymphocytes and hepatocytes. *Cell Death Differ* 2009;**16**:1062–70.

Anexo 1. Aceite do Comitê de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 23 de setembro de 2008

Ofício nº 3459/2008.
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS E GENES PRÓ E ANTI-APOPTÓTICOS EM MIELOFIBROSE E TROMBOCITEMIA ESSENCIAL”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 274ª Reunião Ordinária realizada em 22/09/2008 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9298/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

RAQUEL TOGNON

PROFª DRª FABIOLA ATTIE DE CASTRO (Orientadora)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP