

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão de microRNAs em leucócitos e células CD34⁺
em Policitemia Vera**

Natália de Souza Nunes

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão de microRNAs em leucócitos e células CD34⁺
em Policitemia Vera**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para Obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Natália de Souza Nunes

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

*Versão corrigida da **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **Biociências Aplicadas à Farmácia em 25/01/2012**. 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

Nunes, Natália de Souza

Expressão de microRNAs em leucócitos e células CD34⁺ em Policitemia Vera. 2011

91 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Castro, Fabíola

1. microRNAs. 2. Policitemia vera 3. Apoptose.
4. Neoplasias Mieloproliferativas. 5. Expressão gênica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália de Souza Nunes

Expressão de microRNAs em Leucócitos e Células CD34⁺ em Policitemia Vera

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: **Profa. Dra.** Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação em memória da minha avó Maria da Conceição Souza e à minha avó Marta Garcia Nunes mulheres fortes de uma vida de luta e amor sem as quais não existiria a belíssima família SOUZA NUNES.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pacientes, sempre compreensivos, por terem doado as amostras para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Fabíola Attié de Castro por sua orientação, ensinamentos, disponibilidade e amizade que me ajudaram a concretizar esta dissertação. Obrigada por confiar na minha capacidade de realizar este mestrado.

À Prof^a Dr^a Ana Maria de Souza por ser além de uma tia querida uma profissional admirável e exemplo a ser seguido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de mestrado concedida para o desenvolvimento desta pesquisa (2010/01756-3).

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto, representado pelo Prof Dr Dimas Tadeu Covas, por possibilitar a realização de parte dos meus experimentos em suas instalações.

A Dr^a Simone Kashima Haddad, do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela colaboração e disponibilização de seu laboratório de Biologia Molecular, para realização de parte dos experimentos.

À Patrícia Palma e Camila do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela colaboração.

À Fabiana Rosseto de Moraes, do Laboratório de Citometria de Fluxo da FCFRP-USP, pela colaboração.

Às funcionárias da FCFRP-USP e colegas queridas Solange e Jennifer por toda ajuda e “socorro” prestados.

Às amigas de trabalho Luciana Ambrosio, Sandra Burin e Karoline Mendonça pela colaboração e apoio.

À Raquel Tognon Ribeiro amiga querida por não ter hesitado em dividir seus conhecimentos e me possibilitar crescer ‘profissionalmente’.

À Livia Gonzaga Moura, colega e companheira das buscas por paciente, dos experimentos, aprendizado, e amizade fundamental na minha vida.

Aos médicos hematologistas Belinda Pinto Simões, Maria Aparecida Zanichelli, Mary Santana, Elizabeth Xisto Souto por colaborarem na seleção de pacientes e coleta de material para estudo

Às amigas amadas da República Taj Mahal, Adrielle Rezende, Thaís Deliberato, Thaís Gulim e Sabrina Kanai, por acreditarem em mim e me apoiarem desde meus primeiros passos ainda como aluna de IC.

Aos meus amados pais Maria Amélia e Eurípedes por serem meu norte e exemplos de vida.

Às minhas irmãs pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo impagáveis.

Aos meus sobrinhos João Pedro e Luís Miguel, por me darem a oportunidade de sentir este amor sem tamanho.

À minha mais nova e não menos importante companhia, Aislan Eduardo Marques, pelo carinho, respeito, compreensão, por me impulsionar e oferecer o ânimo necessário durante a redação desta dissertação.

A Deus, força maior que sempre guia nossos caminhos.

**“Que ninguém se engane só se consegue a
simplicidade através de muito trabalho”**

Clarice Lispector

RESUMO

Souza-Nunes, Natalia. Expressão de microRNAs em leucócitos e células CD34⁺ em Policitemia Vera. 2011. 91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A Neoplasia Mieloproliferativa Crônica (NMPC)- Politemia Vera é uma desordem clonal caracterizada pelo acúmulo de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e progenitores normais na ausência de um estímulo definido. Apesar dos avanços no diagnóstico de PV e da descrição de mecanismos envolvidos no estabelecimento da doença sua patogênese permanece desconhecida entretanto, alterações no mecanismo regulador da apoptose parecem estar envolvidos em sua fisiopatologia. A compreensão acerca do funcionamento da maquinaria apoptótica e sua possível regulação por microRNAs em pacientes com Policitemia Vera parece revelar novos alvos para estudo e conseqüentemente transformar-se em novas terapias para a doença. Neste contexto os objetivos deste trabalho foram avaliar em leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺ de medula óssea dos pacientes de PV: (1) a quantificação da expressão de microRNAs cujos alvos são RNAs associados a regulação da apoptose; (2) Correlação dos níveis de expressão dos miRNAs com os de RNAs das moléculas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 e dos receptores de morte; (3) Correlação dos níveis de expressão dos miRNAs com os seguintes dados clínico-laboratoriais dos pacientes: concentração de hemoglobina, hematócrito e percentagem da mutação JAK2. Os pacientes com Policitemia Vera apresentam aumento de expressão dos microRNAs 29c, 16, 21, 26a, 130b e let-7d e diminuição de miR15a e 34c em leucócitos de sangue periférico; Aumento de expressão dos miRs 29c, 16 e 21; diminuição na expressão de miR 130b e let-7d em células CD34⁺; alteração na expressão de genes pró e anti-apoptóticos em leucócitos de sangue periférico com aumento de *a1*, *mcl-1* e diminuição de *bcl-2*, *ciap-2*, *bax* e *fas-L*, alteração na expressão de genes pró e anti-apoptóticos em células CD34⁺ com aumento de expressão de *fas*, *bid*, *mcl-1*, *bcl-xl* e *c-flip*; diminuição na expressão de *bik*. Observamos diminuição na expressão protéica de BCL-2 em pacientes quando comparado aos indivíduos controle. Notamos também a correlação entre a alteração na expressão de microRNAs e seus respectivos genes alvo e destes com parâmetros hematológicos analisados. Os linfócitos dos pacientes de PV apresentam maior resistência a apoptose do que os indivíduos controles quando induzidos por: Actinomicina, etoposídeo, citarabina e cicloheximida. Concluindo, os dados obtidos sugerem a participação dos microRNAs na regulação da maquinaria apoptótica e a participação desta desregulação na fisiopatologia da PV. Estes resultados contribuem para o melhor entendimento da fisiopatologia da PV e serão úteis futuramente para o desenho de novos alvos terapêuticos e descrição de marcadores de prognóstico.

Palavras Chave: 1. Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas. 2. Policitemia Vera. 3. Apoptose. 4. microRNAs. 5. Expressão Gênica.

ABSTRACT

Souza-Nunes, Natalia. microRNA expression in leukocytes and CD34⁺ cells in Polycythemia Vera. 2011. 91f. Master. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Polycythaemia vera (PV) is a clonal disorder characterized by an accumulation of normal red and white cells, platelets, and their progenitors in absence of a definable stimulus. Despite the advances in PV diagnosis and the description of the mechanisms involved in disease establishment its pathogenesis remains unclear. The apoptosis deregulation might have a role in PV physiopathology. Fully understanding the basic apoptotic pathway and its potential regulation by microRNA in PV patients cells might unveil targets for manipulation, which may be translated into novel therapies for disease. The aims of this study were to evaluate in leukocytes and CD34⁺ cells: (1) The microRNA expression whose RNA target are associated with apoptosis regulation (2) Correlation between microRNA expression and the mRNA levels of anti and pro-apoptotic family Bcl-2 expression and death receptors; (3) Correlation between microRNA expression and the clinical data of patients: hemoglobin concentration, hematocrit and JAK2 percentage. Patients with Polycythemia Vera shows increased expression of microRNAs 29c, 16, 21, 26a, 130b and let-7d and 34c and 15a decrease in peripheral leukocytes; increased expression of miRs 29c, 16 and 21, decrease in miR130b and let-7d expression in CD34⁺ cells; deregulation in pro and anti-apoptotic gene expression in peripheral leukocytes with increase in *a1*, *mcl-1* and decrease in *bcl-2*, *ciap-2*, *bax* and *fas-L*, deregulation in pro and anti-apoptotic gene expression in CD34⁺ cells with increased expression of *fas*, *bid*, *mcl-1*, *bcl-xl* and *c-flip* and decreased expression of *bik*. Decreased in proteic expression of BCL-2 in peripheral leukocytes of patients when compared to controls. Correlation between de deregulated expression of microRNA and their genes target and those with hematological parameters. Lymphocytes from PV patients shows higher resistance to apoptosis than controls when induced by: Actinomycin, etoposide, cytarabine and cycloheximide. In conclusion the data suggest the involvement of microRNA in apoptosis regulation and the involvement of apoptosis machinery in the PV pathophysiology. These results will contribute for a better understanding of PV pathophysiology and will be useful for the discover of future therapies.

Keywords: 1. Myeloproliferative Neoplasms. 2. Polycythemia Vera. 3. Apoptosis. 4. microRNAs. 5. Gene Expression.

RESUMEN

Souza-Nunes, Natalia. Expresion de microRNAs em los leucocitos y las celulas CD34⁺ em la Policitemia Vera. 2011. 91f. Tesis de maestría. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

La Neoplasia Mieloproliferativa Crônica (NMPC)- Politemia Vera es un transtorno clonal caracterizado por la acumulación de eritrocitos, leucocitos, plaquetas y los progenitores normales en ausencia de un estímulo definido. A pesar de los avances en el diagnóstico de la PV y la descripción de los mecanismos implicados en la aparición de la enfermedad, su patogenia se desconoce, sin embargo, cambios en el mecanismo de regulación de la apoptosis parecen estar involucrados en su fisiopatología. La comprensión del funcionamiento de la maquinaria de regulación de la apoptosis y su posible microARN en pacientes con Policitemia Vera parece revelar nuevos objetivos para el estudio y, en consecuencia, nuevas terapias para la enfermedad. En este contexto, los objetivos en este estudio fueron evaluar leucocitos de sangre periférica y células CD34 + de la médula ósea de pacientes con PV: (1) cuantificar la expresión de microARN, cuyo objetivo son ARN asociados con la regulación de la apoptosis; (2) Correlación de los niveles de expresión de miRNAs con el ARNm de moléculas pro y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y los receptores de muerte, (3) Correlación de los niveles de expresión de miRNAs con las siguientes características clínicas de los pacientes: la concentración de hemoglobina, hematocrito y porcentaje de JAK2. Los pacientes con policitemia vera tienen aumento de expresión de microARN 29c, 16, 21, 26 bis, 130 B y let-7d y disminución de miR15a y 34c, en leucocitos de sangre periférica, aumento en la expresión de miRs 29c, 16 y 21; disminución en la expresión de miR 130 B y let-7d en las células CD34 +, cambios en la expresión de genes pro y anti-apoptóticos en leucocitos de sangre periférica con aumento de *a1*, *mcl-1* y la disminución de *bcl-2*, *ciap-2*, *bax* y *fas-L*, cambios en la expresión de genes pro y anti-apoptóticos en células CD34 +, con una mayor expresión de *fas*, *bid*, *mcl-1*, *bcl-xl* y *c-flip*; disminución de la expresión de *bik*. Se observó una disminución en la expresión de la proteína BCL-2 en los pacientes en comparación con los sujetos controles. Notamos la correlación entre el cambio en la expresión de microARN y sus genes objetos y aquellos con los parámetros hematológicos analizados. Los linfocitos de pacientes con PV tienen una mayor resistencia a la apoptosis que de los sujetos de control cuando es inducido por: actinomicina, etopósido, citarabina y cicloheximida. Por último, los datos obtenidos sugieren la participación de los microARN en la regulación de la maquinaria apoptótica y la participación de esta desregulación en la fisiopatología de la PV. Estos resultados contribuyen para una mejor comprensión de la fisiopatología de la PV y serán de utilidad para el diseño futuro de nuevas dianas terapéuticas y descripción de marcadores de pronóstico.

Palavras clave: 1. Neoplasia Mieloproliferativa Cronica. 2. Policitemia Vera. 3. Apoptosis. 4. microRNAs. 5. Expresion Génica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas dos pacientes com Policitemia Vera.....	16
Tabela 2 - Características demográficas dos controles de medula óssea do grupo controle (MOC)	17
Tabela 3 - Características demográficas dos controles de sangue periférico (SPC)	18
Tabela 4 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos cDNAs das moléculas envolvidas na apoptose celular, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento (TA).....	24
Tabela 5 - microRNAs selecionados para avaliação e respectivos genes-alvo associados a regulação da apoptose celular.....	25
Tabela 6 - Número de células CD34+coletadas de pacientes e porcentagem (%) de pureza..	31
Tabela 7 - Número de células CD34+ coletadas do grupo controle e porcentagem (%) de pureza	32
Tabela 8 - Detecção da mutação JAK2V617F e porcentagem de alelos mutados em pacientes com Policitemia Vera	33
Tabela 9 - Parâmetros hematológicos das amostras de sangue periférico dos pacientes	35
Tabela 10 - Medianas das porcentagens de apoptose dos linfócitos dos grupos controle e pacientes de PV	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de sinalização de JAK-2 e a mutação V617F. Adaptado de Levine, 2001	3
Figura 2: Localização da mutação JAK2V617F. Adaptado de Delhomeau <i>et al</i> , 2010.....	4
Figura 3: Exemplo de gel de agarose 1% com RNA extraídos de sete amostras de sangue periférico de pacientes e controles. Observa-se a visualização das bandas 28S, 18S e 5S do RNA.....	23
Figura 4: Expressão de microRNAs em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV. Os microRNAs 29c, let-7d, 21 e 26a encontram-se hiperexpressos enquanto que os miR 15a e 34c encontram-se hipoexpressos.....	37
Figura 5: Expressão de microRNAs em células CD34 ⁺ de pacientes . Os microRNAs 29c, 16 e 21 encontram-se hiperexpressos, enquanto que os microRNAs 130b, let-7d e 15a encontram-se hipoexpressos nas células CD34 ⁺ dos pacientes com PV.	39
Figura 6: Expressão de genes pró e anti-apoptóticos em leucócitos de pacientes. Houve diferença na expressão do gene <i>bax</i> e não se observou diferença na expressão dos genes <i>fas</i> , <i>fas-L</i> , <i>bid</i> e <i>bik</i> ($p > 0,05$).....	41
Figura 7: Expressão de genes pró-apoptóticos em células CD34 ⁺ de pacientes. Pró-apoptóticos <i>bid</i> e <i>fas</i> hiperexpressos, para os genes <i>bik</i> e <i>bax</i> não se observou diferença significativa nos níveis de expressão em relação aos controles ($p > 0,05$)	43
Figura 8: Expressão de genes anti-apoptóticos em leucócitos de sangue periférico de pacientes. Expressão dos anti-apoptóticos <i>bcl-2</i> diminuída, <i>a1</i> e <i>mcl-1</i> aumentada e expressão dos genes <i>bcl-xl</i> , <i>ciap-2</i> e <i>c-flip</i> sem diferenças significativas em relação aos controles	45
Figura 9: Expressão de genes anti-apoptóticos em células CD34 ⁺ de pacientes com PV. A expressão do gene <i>bcl-2</i> está elevada nos pacientes em comparação com controles. Não há diferenças significativas na expressão dos genes <i>a1</i> , <i>mcl-1</i> , <i>bcl-x_L</i> , <i>ciap-2</i> e <i>c-flip</i> ($p > 0,05$) entre as células dos pacientes e controles.....	47
Figura 10: Correlação entre os valores de expressão dos microRNAs e a expressão dos genes alvos.....	48
Figura 11: Correlação entre os valores de expressão dos microRNAs e a expressão dos genes alvos.....	49
Figura 12: Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão de microRNAs.....	50

Figura 13: Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão de microRNAs em células CD34 ⁺	51
Figura 14: Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão gênica	53
Figura 15: Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão gênica em células CD34 ⁺	54
Figura 16: Porcentagem de linfócitos marcados com anexina V-FITC. A apoptose das células mononucleares de pacientes e controles foi induzida por ACT 1uM, ACT 5uM, STS 1uM e 5uM e VM26 25uM, VP16 25uM e ARA-C 25Um.....	55
Figura 17: Detecção da proteína BCL-2 em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera..	56
Figura 18: Detecção da proteína BAX em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera.....	56
Figura 19: Participação dos apoptomirs na regulação da maquinaria apoptótica	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD - solução de ácido cítrico, citrato, dextrose
 AIF – *Apoptosis-inducing factor*
 AKT – *Serine/threonine-specific protein kinase*
 APAF-1 – *Apoptosis protease-activator factor 1*
 ATP- adenosina Trifosfato
 a1- bcl-2 related protein A1
bad – *bcl-2 antagonist of the cell death*
bak – *bcl-2 homologous antagonist/killer*
bax – *bcl-2 associated X protein*
bcl-x – *bcl-2 related gene*
bcl-w – *Antiapoptotic bcl-2 family member*
bcl-2 – *B-cell CLL / lymphoma 2*
bcr-abl – *break cluster region - Abelson*
bid – *BH3-interacting domain agonist*
bik – *bcl-2-interacting killer*
bim – *bcl-2-interacting mediator*
bok – *bcl-2-related ovarian killer*
 c-DNA – *complementary DNA synthesized for reverse transcriptase*
 CFU-E- Unidade formadora de colônia eritróide
 c-MPL – receptor de trombopoetina
c-iap-2 – *Baculoviral IAP repeat-containing 3, apoptosis inhibitor 2*
 Ct - *Threshold cycle*
 dATP- desoxiadenosina trifosfato
 DD - Death domain
 DIABLO – *Direct inhibitor of apoptosis protein (IAP) - binding protein with low PI*
 DISC – *Death-inducing signaling complex*
 DNA – Ácido desoxirribonucléico
 DSM- Doença sistêmica dos mastócitos
 DR4 – *Death receptor 4 (TRAIL receptor 1)*
 DR5 – *Death receptor 5 (TRAIL receptor 2)*
 ECL – *Enhanced chemiluminescent*
 EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
 EPO – eritropoetina
 ERK – *Extracelular sinal-regulated kinases*
 FADD - Proteínas adaptadoras FAS associada com DD
 FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
 Fas/CD95 – Receptor de morte
Fas-L – *fas ligand*
 FCFRP-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP
 FITC – *Fluorescein isothiocyanate*
flip – *Like caspase-8 (FLICE)-inhibitory proteins*
 GM-SCF- Fator estimulador de colônia granulocítica macrocítica
 Hb- Hemoglobina

HCFMRP-USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP
Ht- Hematócrito
IDV – *Integrated density value*
IAPs – *Inhibitory apoptosis proteins*
IGF-I- *insulin-like growth factor*
IL-3 – *Interleucina 3*
JAK – *Tyrosine kinases of the Janus kinase family*
JAK2 – *Janus Kinase 2*
JAK2 V617F – *Janus Kinase 2* mutada no aminoácido 617, troca de Valina por Fenilalanina
JH2 – *JAK homology 2*
JH1 – *JAK homology 1*
kDa- Kilodaltons
LEL - Leucemia eosinofílica
LMC – Leucemia mielóide crônica
LMCA - Leucemia mielóide crônica atípica
LMMC – Leucemia mielomonocítica crônica
LNC – Leucemia neutrofílica crônica
MAPK – *Mitogen-activating protein kinase*
mcl-1 – Myeloid cell leukemia
MF – Mielofibrose
MOC – Medula óssea do controle
MOP – Medula óssea de paciente
NMPC- Neoplasia mieloproliferativa crônica
noxá – Proapoptotic BH3-only member of bcl-2
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – *Phosphate buffer solution*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PI3K – *Phosphoinositol - 3 kinase*
puma – p53-up-regulated modulator of apoptosis
PV – Policitemia vera
PVDF - *Polyvinylidene difluoride*
RNA – Ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
SCF – *stem cell factor*
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SHE- Síndrome hipereosínofílica
siRNA – *short interfering RNA*
SMAC – *Second mitochondria-derived activator of caspases*
SPC – Sangue periférico do controle
STAT – *Signal transducers and activators of transcription*
TA – Temperatura de anelamento do *primer*.
TE – Trombocitemia essencial
TNF – *Tumor necrosis factor*
TNF-R – *Tumor necrosis factor receptor*
TRADD- *Tumor necrosis factor associada a DD*
TRAIL – *TNF related apoptosis-inducing ligand*
USP- Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Policitemia Vera	1
1.2. Apoptose, MicroRNAs e Doenças Mieloproliferativas Crônicas	5
2. OBJETIVOS	14
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
3.1. Casuística.....	15
3.2. Métodos	19
3.2.1. Obtenção de células mononucleares, leucócitos e células precursoras hematopoéticas	19
3.2.2. Determinação do Hemograma dos Pacientes	21
3.2.3. Detecção da mutação JAK2 V617F no sangue periférico	21
3.2.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real	22
3.2.5. Seleção de microRNAs para análise dos níveis de expressão	25
3.2.6. Detecção da Expressão de microRNAs por PCR em tempo real	26
3.2.7. Indução de apoptose celular e detecção por citometria de fluxo	27
3.2.8. Detecção de proteínas pró e anti-apoptóticas por <i>Western Blot</i>	28
3.2.9. Análise Estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Determinação da pureza das células CD34 ⁺ por citometria de fluxo	30
4.2. Detecção da mutação JAK2 V617F em leucócitos de sangue periférico e porcentagem de alelos mutados	30
4.3. Parâmetros hematológicos das amostras de sangue periférico dos pacientes com Policitemia Vera	34
4.4. Expressão de miRNA em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV e controles	36

4.5. Análise da Expressão de miRNAs em células CD34 ⁺ de medula óssea de pacientes com PV e controles.....	38
4.6. Análise da expressão de genes pró-apoptóticos envolvidos na apoptose, alvos dos microRNAs analisados	40
4.6.1. Expressão gênica em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV	40
4.6.2. Quantificação da expressão gênica dos alvos dos apoptomirs em células CD34 ⁺ de pacientes com PV e controles.....	42
4.7. Expressão de genes anti-apoptóticos alvos dos microRNAs analisados.....	44
4.7.1. Quantificação da expressão dos genes anti-apoptóticos alvos dos apoptomirs no sangue periférico de pacientes e controles	44
4.7.2. Quantificação dos níveis de expressão gênica em células CD34 ⁺ em comparação ao grupo controle.....	46
4.8. Correlação dos níveis de expressão dos apoptomirs com a expressão de genes alvos em pacientes com PV	48
4.8.1. Em leucócitos do sangue periférico.....	48
4.8.2. Em células CD34 ⁺ de pacientes.....	49
4.9. Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão dos microRNAs.....	50
4.9.1. Em leucócitos de pacientes com PV.....	50
4.9.2. Em células CD34 ⁺ de pacientes com PV.....	51
4.10. Correlação dos níveis de expressão dos genes reguladores da apoptose com parâmetros hematológicos	52
4.10.1. Em leucócitos de pacientes com PV.....	52
4.10.2. Em células CD34 ⁺ de pacientes com PV.....	54
4.11. Análise da porcentagem de linfócitos dos pacientes resistentes à apoptose.....	54
4.12. Análise da expressão protéica em leucócitos do sangue periférico por <i>Western Blot</i>	56
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXO.....	71
9. APÊNDICE	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Policitemia Vera

Neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC) são doenças hematológicas clonais, nas quais há proliferação de uma ou várias células de linhagens mielóides alteradas (DELHOMMEAU *et al.*, 2007). Caracterizam-se pela independência ou hipersensibilidade dos progenitores hematopoéticos a numerosas citocinas (SPIVAK, 2004). As bases moleculares da maioria das NMPC Ph- são desconhecidas, mas utilizando o modelo da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) acredita-se que a atividade de uma tirosina-quinase constitutiva possa estar envolvida na fisiopatologia dessas doenças (JAMES *et al.*, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica essas doenças em dois grupos, o grupo das NMPC clássicas: Leucemia Mielóide Crônica (LMC), Policitemia vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose Idiopática (MFI), e o grupo das NMPC menos frequentes: Leucemia Neutrofílica Crônica (LNC), Síndrome Hipereosinofílica/Leucemia Eosinofílica Crônica (SHE/LEC). Há outro grupo, das NMPC não classificadas, com características intermediárias entre as NMPC e síndromes mielodisplásicas, no qual estão inclusas a Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC), a Doença Sistêmica dos Mastócitos (DSM) e a Leucemia Mielóide Crônica Atípica (LMCA) (DELHOMMEAU *et al.*, 2006; LEVINE *et al.*, 2007).

Dentre as NMPC, essa introdução enfocará PV, visto que a referida doença foi empregada nessa investigação. A PV é uma doença neoplásica hematológica que se origina de uma célula tronco hematopoética multipotente alterada. Caracteriza-se por apresentar acúmulo de eritrócitos, leucócitos e plaquetas morfológicamente normais e seus precursores na ausência de estímulo definido, sendo, portanto, considerada uma doença *mieloacumulativa* (SPIVAK, 2002).

A etiologia, evolução e fisiopatologia da PV ainda não estão esclarecidas. Após a descrição da mutação na tirosina-quinase Janus kinase 2 (JAK2), em 2005, durante o Terceiro Congresso Internacional sobre Síndromes Mieloproliferativas e Mielodisplásicas (Third International Congress on Mieloproliferative and Myelodysplastic Syndromes), os critérios para diagnóstico das NMPCs foram reavaliados e alterados pela Organização Mundial da Saúde em 2008. Assim sendo, os novos critérios de diagnóstico são:

1) Critérios Maiores-

- hemoglobina > 18.5 g/dL para homens, 16.5 g/dL para mulheres ou outra evidencia do aumento de volume eritrocitário;
- detecção da presença da mutação V617F do gene da JAK2 ou outra mutação, como por exemplo a mutação no éxon 12;

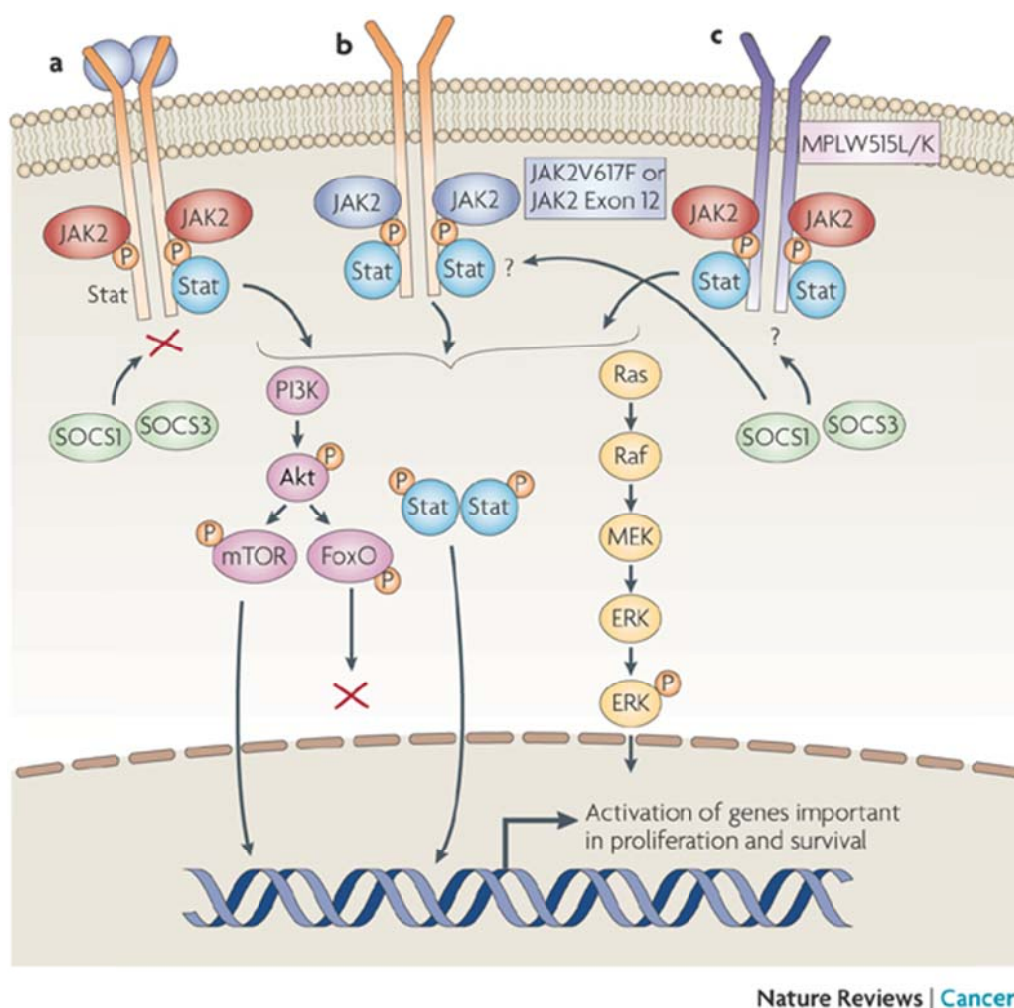
2) Critérios Menores-

- Biópsia de medula óssea demonstrando hiper celularidade compatível com a idade, com proeminente proliferação eritrocítica, granulocítica e megacariocítica (panmielose);
- Níveis de eritropoetina sérica abaixo dos valores normais;
- Formação de colônias eritróides endógenas *in vitro*.

Para confirmação da hipótese diagnóstica o paciente deve apresentar os dois critérios maiores e um critério menor ou o primeiro critério maior acompanhado de dois critérios menores (VARDIMAN *et al.*, 2009).

A família das proteínas Janus Kinase (JAK) compreende quatro quinases (JAK1, 2,3 e TYK2) que se ligam a receptores de citocina no domínio citosólico. As JAK quinases possuem dois domínios altamente homólogos na porção carboxi terminal: um domínio com atividade quinase (JH1, JAK *homology*) e um domínio pseudoquinase inativo (JH2). O domínio JH2 é um regulador negativo da atividade quinase de JH1.

JAK2 possui um papel importante na via de sinalização para receptores de citocinas nas células mielóides, através da ligação a três receptores mielóides homodiméricos (EPO-R, MPL (TPO-R), GCSF-R) (VAINCHENKER *et al*, 2011). (Figura1)



Nature Reviews | Cancer

Figura 1: Via de sinalização de JAK-2 e a mutação V617F. As letras a, b e c correspondem aos estímulos extracelulares de ativação da via de sinalização JAK/STAT. Adaptado de Levine, 2001;

A mutação JAK2V617F é uma mutação pontual caracterizada pela troca de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 1849 do cDNA no éxon 14 (Figura 1) do gene. O aminoácido valina encontra-se localizado na interface entre os domínios JH1 e JH2 e a troca por uma felilalanina esta associada á diminuição do controle do domínio inibitório JH2 sobre

o domínio quinase JH1 acarretando a ativação constitutiva da proteína. (VAINCHENKER *et al*, 2011). (Figura 2)

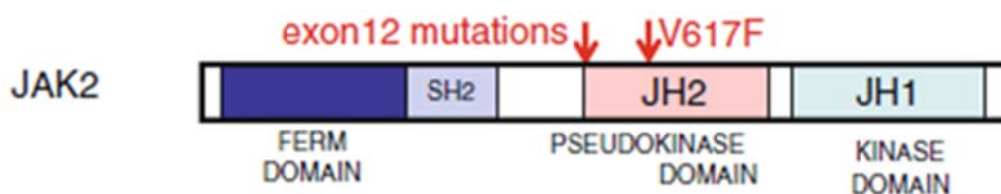


Figura 2: Localização da mutação JAK2V617F. Adaptado de Delhommeau *et al*, 2010.

Segundo Delhommeau e colaboradores (2006), as diferenças na frequência e nas características fenotípicas que envolvem a mutação JAK2 V617F nas NMPC geram questões a respeito de seu papel como causa primária e na heterogeneidade clínica e biológica destas doenças. Foi postulado que os níveis da atividade quinase de JAK2 V617F poderiam determinar o fenótipo da doença. A maioria dos pacientes com PV apresenta progenitores hematopoéticos com clones homozigóticos para a mutação, contudo, em portadores de TE e MF, estes clones estão ausentes, o que sugere que a dupla dose da mutação favorece o aumento da sinalização para proliferação de clones homozigóticos comparada aos clones heterozigóticos.

Hipóteses têm sido propostas para justificar as diferenças do papel da JAK2 V617F nas NMPC. Eventos moleculares adicionais parecem interferir na atividade da JAK2 quinase, como: as alterações citogenéticas, dentre elas a anormalidade mais frequente nos pacientes com PV é del (20q). A trissomia do cromossomo 9 também é relevante por aumentar a atividade tirosina-quinase de JAK2V617F (VAINCHENKER *et al*. 2007). Outros fatores parecem contribuir para o fenótipo da PV como o gênero, como importante modificador genético; a capacidade de regulação das fosforilases e proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS); polimorfismos e mutação de receptores de citocinas (DELHOMMEAU, 2006).

Apesar dos novos conhecimentos sobre essa entidade nosológica, até o presente momento não há qualquer característica fisiopatológica completamente definida, nenhum critério de estadiamento e nem marcadores de prognóstico descritos específicos da PV.

Com relação às possibilidades terapêuticas para PV, não há até o momento uma terapia curativa, o tratamento é escolhido com base nos fatores de risco dos pacientes de acordo com classificação OMS. Baixas doses de aspirina demonstram boa atividade antitrombótica e são indicadas para pacientes de qualquer faixa de risco. Hidroxiuréia tem sido a terapia de escolha até o momento para pacientes com alto risco de ocorrência de eventos trombóticos e sangramento e paralelamente vários *trials* utilizando inibidores da tirosina quinase JAK2 tem sido realizados (TEFERRI, 2011; VANNUCCHI; GUGLIELMELLI, 2010).

Nesse contexto, estudos dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos em sua patogênese seriam importantes na busca de novas ferramentas destinadas ao seu diagnóstico diferencial e para descrição de novos alvos terapêuticos.

Visando à obtenção de melhor conhecimento a despeito da fisiopatologia da PV, nosso grupo de pesquisa detectou nos pacientes com PV, a expressão alterada de alguns genes que regulam a apoptose celular e a resistência das células mononucleares a apoptose mediada por agentes apoptogênicos. Com o intuito de aprofundar o conhecimento dos mecanismos moleculares que são responsáveis pela alteração do processo de apoptose em pacientes com PV, o objetivo desse trabalho foi checar a expressão de microRNAs que possuem como alvo moléculas envolvidas na apoptose nas células CD34⁺ e leucócitos desses pacientes. Além disso, observar o efeitos do inibidor de JAK2 na modulação dos microRNAs.

1.2. Apoptose, MicroRNAs e Doenças Mieloproliferativas Crônicas

A apoptose pode ser definida como um processo de morte celular programada regulado pelas proteínas das famílias de Bcl-2, receptores de morte e proteínas inibidoras da apoptose (DEJEAN *et al.*, 2010).

A desregulação desse processo, ou seja, sua exacerbação ou inibição contribui para a fisiopatologia de doenças, tais como neoplasias, doenças auto-imunes e neurodegenerativas (DEJEAN, *et al.*, 2010).

Conhecer os mecanismos de sinalização da morte celular e seus pontos de regulação é essencial para a compreensão da patogênese dessas doenças que resultam na alteração destas vias e para a busca por alternativas terapêuticas eficientes.

A apoptose pode ser desencadeada por diferentes estímulos incluindo a retirada de fatores de crescimento, exposição à luz ultravioleta, radiação gama, quimioterapia ou pelos agonistas de receptores pertencentes à família de proteínas transmembrana dos “receptores de morte celular” (THOMADAKI; SCORILAS, 2006)

As principais vias de sinalização da apoptose são: as vias intrínseca e extrínseca. A via intrínseca ou mitocondrial é induzida por sinais de estresse intracelular, como irradiações, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular, cujos efeitos finais convergem para a mitocôndria, promovendo a liberação de citocromo c, AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*)/DIABLO (*Direct Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)- Binding Protein with Low PI*), Omi/Htr2 e Endonuclease G para o citosol, resultando na ativação de APAF-1 (*Apoptosis Protease-Activator Factor 1*). O APAF-1 na presença de ATP/dATP e citocromo C, induz a formação do complexo multimérico chamado “apoptossomo”. O apoptossomo medeia a ativação da caspase iniciadora, caspase-9, que subsequentemente ativa as caspases executoras, -3, -6 e -7, responsáveis pelo desmantelamento celular característico da apoptose (WANG, 2001; YAN; SHI, 2005).

Essa via de ativação da apoptose celular é regulada pelo balanço da participação de proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2, tais como Bcl-x_L, Mcl-1, A1, Bcl-w e Bcl-2

que são inibidoras e Bad, Bax, Bak, Bid, Bik, BIM, Bmf, Bok, Boo, Puma, Noxa, Bcl-x_s proteínas que são pró-apoptóticas (HALE *et al.*, 1996; BORNER, 2003).

A ativação da via extrínseca pode ser desencadeada por receptores de morte na ausência de um estímulo externo, por exemplo, via receptores FAS (FAS/CD95), TNF-R1 e R2 (*tumor necrosis death receptor*), TRAIL (*TNF related apoptosis-inducing ligand receptors*) R1 (DR4) e R2 (DR5) (JIN, EL-DEIRY, 2005; YAN, SHI, 2005). Nessa via, o ligante extracelular se associa aos receptores de morte (pertencentes à superfamília TNFR-*Tumor Necrosis Factor Receptor*), como CD95 e TNF-R1, que pelos seus domínios citoplasmáticos interagem com moléculas adaptadoras como o FADD e o TRADD. A transdução do sinal determina a ativação de caspases iniciadoras, como caspase 8 e caspase 10, resultando na ativação de caspases efetoras, como caspase 3 e 7 (revisado em AMARANTE-MENDES, 1999).

A família das caspases em mamíferos é composta por 14 proteínas, dentre as quais estão as caspases envolvidas no processo de apoptose, a saber, caspases iniciadoras (caspases -8 e -10), caspases ativadoras (caspases -9, -2), que ativam as caspases executoras (caspases -3, -6 e -7) responsáveis pelo desmantelamento celular (JIN, EL-DEIRY, 2005). Para que essas proteínas sejam ativadas, são necessários estímulos que resultem em sua clivagem e dimerização, desencadeando cascatas de eventos que contribuem para indução de apoptose.

A apoptose também é susceptível a regulação negativa pelas proteínas da família dos inibidores de apoptose, as IAP (c-IAP-1 e -2, X-IAP e Survivina), que inibem as caspases executoras e são bloqueadas pelo SMAC (HUANG, 2002; SHI, 2002).

Sabe-se que na Leucemia Mielóide Crônica (LMC), neoplasia mieloproliferativa crônica, células precursoras hematopoéticas malignas são mais resistentes a apoptose do que as normais devido à expressão da tirosina-quinase Bcr-Abl, que prolonga a sobrevivência da célula e é considerada uma das mais potentes moléculas anti-apoptóticas (BRUMATTI *et al.*,

2003; BUENO-DA-SILVA., 2008). A oncoproteína Bcr-Abl induz a ativação de STAT5 na LMC e aumenta a expressão de Bcl-x_L e diminui a de Bcl-2 (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998). Castro e colaboradores (2005) também relataram a expressão aumentada dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *a1*, *mcl-1* e *flip* em pacientes portadores de LMC. Esse mesmo trabalho mostrou que a expressão desses genes aumenta com a progressão da doença, o que contribuiria para a resistência das células leucêmicas a apoptose e resistência dos pacientes ao tratamento nas fases avançadas da LMC.

Na PV, defeitos no controle da apoptose parecem colaborar para o acúmulo de células eritróides sem a necessidade de eritropoetina (FERNANDEZ-LUNA, 1999). Assim grupos de pesquisa sugerem que o aumento da produção de eritrócitos seria consequência do acúmulo de células precursoras e da mieloproliferação presente na PV (FERNANDEZ-LUNA *et al.*, 1998).

Progenitores eritróides na PV são hipersensíveis a diversos fatores de crescimento incluindo IL-3, GM-CSF, SCF e IGF-I (*Insulin-like growth factor*) (CORREA *et al.*, 1994). Na ausência de IGF-1 exógeno, o nível basal de tirosina fosforilada do receptor de IGF-1 é muito maior em PV do que em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normais. IGF-1 circula ligada a proteínas específicas (IGFBP-1 a 6) que regulam sua disponibilidade e atividade. Em pacientes com PV, os níveis plasmáticos de IGFBP-1 são quatro vezes mais elevados que os níveis observados em controles. IGFB-1 é capaz de estimular formação de *burst* eritróide por aumentar a sensibilidade da célula ao IGF-1 (MIRZA *et al.*, 1997). IGF-1 age sobre progenitores hematopoéticos inibindo apoptose e este efeito na sobrevivência da célula requer a atividade intercelular da fosfatidilinositol 3 – kinase (PI3K) (KELLEY *et al.* 1998). PI3K fosforila inositol de lipídeos que agem como segundos mensageiros para diversos alvos, incluindo a serina-treonina Akt kinase. Ativação de Akt fosforila a proteína apoptótica BAD, prevenindo a ligação com a proteína anti-apoptótica Bcl-

x_L , um mecanismo que pode levar à inibição de apoptose (DOWNWARD, 1998). Dai e colaboradores (2005) demonstraram aumento na fosforilação de Akt/PKB nas unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) em PV, em resposta a SCF e EPO, quando comparada à CFU-E normal.

Em indivíduos sadios o Bcl- x_L é expresso em células eritróides somente nos estágios dependentes de EPO da diferenciação eritróide normal (eritroblastos imaturos). Entretanto, células eritróides de pacientes com PV cultivadas na ausência de EPO expressam Bcl- x_L em todos os estágios de diferenciação e os eritroblastos mais maduros expressam níveis mais altos de Bcl- x_L . Assim, a expressão desregulada de Bcl- x_L pode contribuir para a sobrevivência da linhagem eritróide EPO-independente na PV. A região promotora do gene Bcl- x_L contém uma sequência consistente com a ligação de STAT, o qual é o principal fator que medeia o efeito da EPO na transcrição de genes em células eritróides e pode transativar o promotor *bcl-x* em resposta à EPO nos progenitores eritróides (ODA *et al.*, 1998; FERNANDEZ-LUNA *et al.*, 1998).

Os pacientes portadores de PV positivos para a mutação V617F apresentam ativação constitutiva de STAT5, o que poderia alterar todo o mecanismo de regulação da apoptose das células precursoras ou maduras da linhagem mielóide e níveis de Bcl- x_L .

Silva e colaboradores descreveram que precursores eritróides de pacientes com PV expressavam a proteína anti-apoptótica Bcl- x_L em proporção muito maior que precursores presentes em indivíduos normais. O aumento da expressão dessa proteína resultaria na resistência das células precursoras a apoptose e na diferenciação dessas células independentemente de EPO (FERNANDEZ-LUNA *et al.*, 1998).

Por outro lado, Zhang e colaboradores (2004), avaliando a expressão de Bcl- x_L em pacientes com TE durante a diferenciação megacariocítica em pacientes com TE, constataram que a expressão da proteína Bcl- x_L está diminuída precocemente em culturas de

megacariócitos *in vitro*, na presença de TPO. Esse dado sugere que a desregulação desta expressão poderia explicar, ao menos em parte, a superprodução e diferenciação de plaquetas, já que Bcl-x_L é essencial para a megacariocitopoese.

Cabe aqui ressaltar que nosso grupo de pesquisa (GASPAROTTO, 2009) detectou, em células CD34⁺ e leucócitos de pacientes com PV, alteração da expressão de alguns genes e proteínas anti-apoptóticos (*bcl-2*, *ciap-2*, *ciap-1*, *c-flip* e *a1*) e pró-apoptóticos (*noxa*, *fas* e *bax*) que controlam a apoptose, o que nos permite especular sobre a possível desregulação desse processo na patogênese dessa doença.

O presente trabalho investigou a expressão de microRNAs que possuam como alvos genes relacionados à regulação da apoptose (apoptomirs). A finalidade foi checar se a alteração de genes envolvidos na apoptose estava associada a modulação por microRNAs.

MicroRNAs são RNAs não codificantes com 18 a 22 nucleotídeos que regulam genes repressores pós transcricionais inibindo a tradução de proteínas ou desestabilizando alvos dos RNAm por clivagem ou desadenilação (ZHAO, 2007).

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, 60-100 nucleotídeos, que após translocação para o citoplasma, serão processados pela enzima Dicer, RNA polimerase III, formando miRNAs maduros de aproximadamente 22 nucleotídeos. Após a clivagem, a fita antisense, termodinamicamente mais favorável, do miRNA é incorporada ao complexo RISC que promoverá a ligação ao RNAm alvo (BEEZHOLD, 2010).

A frequente localização dos microRNAs em regiões frágeis tais como *breakpoints*, regiões de amplificação ou perda na heterozigose sugerem que sua participação seja relevante na carcinogênese. (VECCHIONE; CROCCE, 2010).

Mais de 700 microRNAs foram identificados em humanos (GRIFFITHS *et al.*, 2008) e cada um é capaz de regular potencialmente a expressão de milhares de RNAs (FRIEDMAN *et al.*, 2009).

Os miRNAs estão diferencialmente expressos em diversos tecidos e a maioria apresenta padrões de expressão dependente do contexto celular, como observado em células hematopoéticas e pancreáticas (MATTICK *et al.*, 2005). Defeitos na biogênese da maquinaria dos microRNAs podem participar da formação de tumores (KUMAR *et al.*, 2007). Vários microRNAs parecem estar envolvidos na regulação do processo de apoptose, como os relatados em células de carcinoma de ovário, na linhagem HELA, em que os miR-95, -124, -125, -134, -144 tiveram sua atividade inibida e proporcionaram uma diminuição no crescimento celular (CHENG *et al.*, 2005).

Cheng e colaboradores (2005) também relataram que a baixa expressão dos miRNAs -1d, 7, 148, 204, 210, 216 e 296 estava associada a exacerbação da apoptose em células da linhagem HELA que conseqüentemente conduziu redução do crescimento celular. Num estudo similar, também em células HELA, foi observado que a expressão dos microRNAs let-7c, miR-10^a, miR144 e miR150 são capazes de influenciar o processo de apoptose por meio da ativação ou bloqueio da caspase-3 (OVCHARENKO *et al.*, 2007; SPIZZO, 2009).

Assim sendo, nos últimos anos, os microRNAs emergiram como o principal regulador da expressão de proteínas e RNAs, envolvidos nas funções celulares tais como, desenvolvimento, proliferação, apoptose e diferenciação em várias doenças. No entanto, questões relacionadas ao modo de ação dos microRNAs ainda persistem (SUBRAMANIAN, 2010), bem como seu papel na tumorigênese e leucemogênese.

Calin e colaboradores (2002) encontraram nas células leucêmicas de 70% dos pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica a deleção ou baixa expressão dos miRNA-15a e miRNA-16-1. Esses dois miRNAs estão expressos em níveis elevados em linfócitos normais, mas nos pacientes com LLC apresentaram baixa expressão a qual foi correlacionada aos altos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Esses achados nos pacientes com LLC podem explicar pelo menos em parte a resistência dos linfócitos leucêmicos a apoptose (CIMMINO *et al.*, 2005). Zanette e colaboradores (2007), determinaram o perfil de expressão de miRNAs em LLC e leucemia linfóide aguda (LLA) e relataram o aumento de miR-331 em LLC associado à linfoproliferação e sobrevivência celular. A “superexpressão” de miR-17-92 também verificada nessa pesquisa foi relacionada à patogênese e resistência das células à apoptose na LLA. Outros dados que chamam a atenção para a relação dos microRNAs e neoplasias hematológicas são a descrição de que, em células B leucêmicas, os altos níveis de miR-142 induzem elevação de *c-myc* e intensa proliferação celular e o relato da elevada expressão de miR-155 em pacientes com Linfoma de Burkitt (METZLER *et al.*, 2004).

Venturini e colaboradores (2007) descreveram a relação positiva entre a alta expressão dos miRNAs codificados dentro do *cluster* miR-17-92 policistrônico, a expressão de c-MYC e a proliferação celular das células Bcr-Abl⁺. No mesmo trabalho, os autores relatam que a expressão diferencial desse *cluster* está associada às fases da LMC. Os miRNAs podem controlar centenas de “genes alvo”, o que ressalta o papel dessas moléculas sobre o perfil de expressão gênica e protéica nas células (KERSCHER; SLACK 2006).

Outras publicações têm mostrado que a presença de mutações em miRNAs estão correlacionadas ao desenvolvimento de neoplasias humanas, indicando a possibilidade dessas moléculas atuarem como genes supressores de tumor ou como proto-oncogenes (KERSCHER; SLACK, 2006).

A relação entre a regulação da apoptose e miRNAs pode ser ilustrada por meio do trabalho de Cimmino e colaboradores (2005), os quais mostraram que miR-15a e miR-16-1 regulam negativamente o gene anti-apoptótico *bcl-2*, cuja expressão é elevada em linfomas e leucemias. Dessa forma, foi demonstrado que a deleção de miR-15a e miR-16-1 resulta no aumento da expressão de *bcl-2* promovendo resistência à apoptose celular que contribui para o fenótipo leucêmico (KERSCHER; SLACK, 2006; ZHANG *et al.*, 2006) na LLC. A expressão de um desses miRNAs em linhagens celulares com altos níveis de *bcl-2* causou diminuição dos níveis de Bcl-2 e acentuou a susceptibilidade da célula a apoptose, contudo, sem afetar os níveis de RNA mensageiro de *bcl-2*, o que indica uma regulação de expressão pós-transcricional por parte dos miRNAs.

Ainda na LLC, Careta e colaboradores (2007) observaram que a “superexpressão” das moléculas *ezrin* e *c-flip* estavam ligadas a expressão de miR-96, miR-183 e miR-20. Estes autores sugerem que, como os miRNAs apresentam importante função na regulação gênica, é possível que essas moléculas modulem *c-flip* e *ezrin*, interferindo na proliferação e apoptose dos linfócitos leucêmicos do tipo B de pacientes com LLC.

Com base no exposto na relação entre regulação da apoptose e microRNA e das observações de que pacientes com PV possuem desregulação da maquinaria apoptótica, esse trabalho objetivou a detecção de apoptomirs em pacientes com PV.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- 1) Quantificar a expressão de miRNAs, cujos alvos são RNAs associados a regulação da apoptose, em células CD34+ e leucócitos de pacientes com policitemia vera e indivíduos controles;
- 2) Correlacionar os níveis de expressão dos miRNAs com os de RNAm das moléculas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 e dos receptores de morte nas células dos pacientes com policitemia vera;
- 3) Correlacionar os níveis de expressão dos miRNAs com os seguintes dados clínico-laboratoriais dos pacientes: concentração de hemoglobina, hematócrito e percentagem da mutação JAK2.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram avaliados 30 pacientes com Policitemia Vera, com idade média de 64,7 anos (faixa etária: 39-83 anos), treze do gênero masculino e dezessete do gênero feminino, sendo três negros, dois asiáticos, um mulato e vinte e quatro brancos. Os pacientes foram provenientes do Hospital Brigadeiro de São Paulo, atual Hospital de Transplantes 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 na Introdução e as características demográficas dos pacientes estão apresentadas na tabela 1.

O grupo controle foi composto por 30 indivíduos saudáveis, doadores voluntários de sangue periférico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sendo treze do gênero masculino e dezessete do gênero feminino, três negros e vinte e sete brancos, com idade média de 60,2 anos (faixa etária: 38-83 anos) e 23 doadores de medula óssea do HCFMRP-USP, 14 do gênero masculino e 9 do gênero feminino, 21 brancos, um negro, dois mulatos, com média de idade de 32,6 anos (faixa etária: 16-54 anos). As características demográficas dos controles de sangue periférico e de medula óssea estão descritas nas tabelas 2 e 3.

A seleção e o acompanhamento clínico dos pacientes foram realizados pelos hematologistas Profa. Dra. Belinda Pinto Simões do HCFMRP-USP e Dra. Elizabeth Xisto Souto do Hospital Brigadeiro. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos dos referidos hospitais (Ofício nº 2306/2010 CEP/MGV; aprovado 21/07/2010, conforme processo HCRP nº 4908/2010).

Tabela 1 - Características demográficas dos pacientes com Policitemia Vera

Paciente	Idade (anos)	Gênero	Cor da pele
PV 01	50	F	N
PV02	66	F	B
PV03	80	F	B
PV 04	54	F	N
PV 05	58	M	B
PV 06	59	M	B
PV 07	54	F	B
PV 08	60	F	N
PV 09	68	F	B
PV 10	83	F	B
PV 11	52	M	B
PV 12	73	F	B
PV 13	45	F	B
PV 14	54	F	B
PV 15	76	M	A
PV 16	39	F	B
PV 17	75	M	B
PV 18	60	M	B
PV 19	57	M	B
PV 20	51	F	B
PV21	79	M	B
PV22	61	M	A
PV23	47	M	B
PV24	56	M	B
PV25	65	F	B
PV26	69	F	B
PV27	69	F	B
PV28	61	F	B
PV29	45	M	Mul
PV30	65	M	B

PV (pacientes com Policitemia Vera), F (Feminino), M (Masculino), B (Branco), N (Negro) e Mul (Mulato).

Tabela 2 - Características demográficas dos controles de medula óssea (MOC).

Doador	Idade (anos)	Gênero	Cor da Pele
MOC1	29	M	N
MOC2	16	F	B
MOC3	30	M	B
MOC4	36	M	B
MOC5	54	M	B
MOC6	30	M	B
MOC7	26	M	B
MOC8	53	F	B
MOC9	40	M	B
MOC10	49	M	B
MOC11	21	F	B
MOC12	24	F	B
MOC13	30	M	M
MOC14	32	F	B
MOC15	20	F	B
MOC16	26	F	M
MOC17	30	M	B
MOC18	40	M	B
MOC19	28	M	B
MOC20	48	M	B
MOC21	21	F	B
MOC22	16	M	B
MOC23	25	F	B

MOC (Medula óssea do controle), F (Feminino), M (Masculino), B (Branco), N (Negro), M (Mulato).

Tabela 3- Características demográficas dos controles de sangue periférico (SPC).

Doador	Idade (anos)	Gênero	Cor da Pele
SPC1	50	F	N
SPC2	66	F	B
SPC3	80	F	B
SPC4	54	F	N
SPC5	59	M	B
SPC6	58	M	B
SPC7	54	F	B
SPC8	60	F	N
SPC9	68	F	B
SPC10	83	F	B
SPC11	50	M	B
SPC12	71	F	B
SPC13	46	F	B
SPC14	55	F	B
SPC15	70	M	B
SPC16	38	F	B
SPC17	72	M	B
SPC18	60	M	B
SPC19	58	M	B
SPC20	49	F	B
SPC21	80	M	B
SPC22	57	M	B
SPC23	45	M	B
SPC24	55	M	B
SPC25	61	F	B
SPC26	69	F	B
SPC27	69	F	B
SPC28	61	F	B
SPC29	44	M	B
SPC30	65	M	B

SPC (sangue periférico dos controles), F (Feminino), M (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 PV e 20 mL de sangue periférico dos controles da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Os sujeitos controle 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 pelos métodos 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 (Voluven[®], Frasenius Kabi, Campinas, Brasil) na proporção de 20 partes de sangue 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 microRNA.

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 500 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 até 1×10^8 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 FACSort (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 2×10^6 foram ressuspensos em 200 µL (diluição 1:1) 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 ensaios posteriores de *Western-Blot*.

As células mononucleares do sangue periférico foram submetidas aos ensaios de indução de apoptose celular com agentes apoptogênicos e armazenadas em nitrogênio líquido em solução de congelamento.

3.2.2. Determinação do Hemograma dos Pacientes

Os hemogramas dos pacientes foram realizados pelo Laboratório Clínico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. O analisador hematológico utilizado foi o Cell Dyn 3500SL, Abbot[®].

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*, em São Paulo, pela técnica de discriminação alélica utilizando PCR em tempo real. (TOGNON *et al*, 2011)

O ensaio utilizou duas sondas fluorogênicas (MGB) para detecção da mutação G → T no éxon 14 do gene JAK2. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (forward: 5'-GCAGCAAGTATGATGAGCAAGCT3'; reverse: 5'-GGCATTAGAAAGCCTGTAGTTTTACTTAC-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 fluorocromos diferentes para permitir a discriminação alélica em um único tubo. Uma delas continha FAM (6-carboxifluoresceína), cujo alvo era 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 final 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 ressuspenso em 13 uL 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 3). 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.

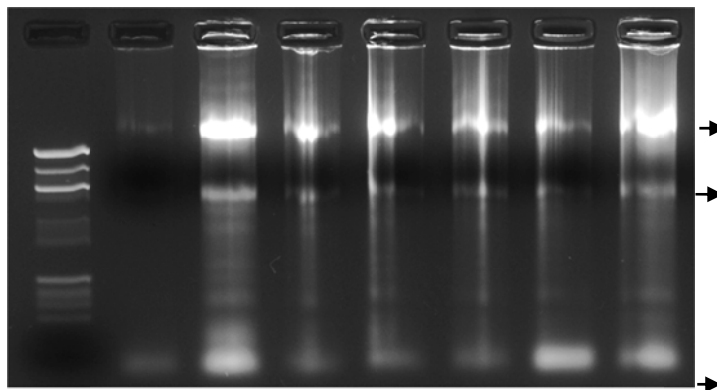


Figura 3: Exemplo de gel de agarose 1% com RNA extraídos de sete amostras de sangue periférico de pacientes e controles. Observa-se a visualização das bandas 28S, 18S e 5S do RNA.

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*, *fasl*, *bax*, *bid*, *bik*) e anti-apoptóticos (*al*, *mcl-1*, *bcl-x_L*, *bcl-2*, *CIAP-2*, *c-flip*) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) (tabela 4). Os programas utilizados no processo de amplificação das amostras foram padronizados durante o desenvolvimento do projeto. 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 PCR em tempo real 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 pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que é calculado considerando-se a razão entre o gene testado e o gene endógeno (*gapdh* e/ou *β-actina*) em relação às amostras controles (calibradores).

Tabela 4 - 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>bik</i>	F: TCT GCA ATT GTC ACC GGT TA R: TTG AGC ACA CCT GCT CCT C	169	60
<i>bid</i>	F: GCT TCC AGT GTA GAC GGA GC R: GTG CAG ATT CAT GTG TGG ATG	203	62
<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-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>fasl</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-2</i>	F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT R: TGC TTT TGC CAG ATC TGT TG	432	58
<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

F:forward; R: reverse.

3.2.5. Seleção de microRNAs para análise dos níveis de expressão

A seleção dos microRNAs analisados foi feita através de ferramentas de bioinformática disponíveis nos 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; Target Scan <http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan> e resultou na escolha de nove microRNAs que possuem dentre seus alvos preditos genes envolvidos no processo de regulação da apoptose e dois controles endógenos os RNU24 e RNU48 para normalização dos dados obtidos (Tabela 5).

Foram pesquisados os microRNAs capazes de regular, modular a expressão das moléculas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2 e receptores de morte que estavam com a expressão desregulada na PV e LMC.

Tabela 5 - microRNAs selecionados para avaliação e respectivos genes-alvo associados a regulação da apoptose celular.

microRNA	Gene alvo
RNU24	<i>Endógeno</i>
RNU48	<i>Endógeno</i>
hsa-let-7d	<i>a1, fas, bax, fasl</i>
hsa-mir-21	<i>ciap-2, fasl, bcl-2</i>
hsa-mir-29c	<i>ciap-1, mcl-1</i>
hsa-mir-15^a	<i>bik, bcl-2</i>
hsa-mir-16	<i>bid, bik, bcl-2, bcl-x_L</i>
hsa-mir-26^a	<i>c-flip, ciap-2, mcl-1</i>
hsa-mir-130b	<i>ciap-2</i>
hsa-mir-34c	<i>bcl-x_L, bik</i>
hsa-mir-451	<i>bik</i>

Os resultados referentes aos níveis de expressão dos microRNAs foram calculados com base nos Cts (*Cycle Threshold*) obtidos para genes alvo e *housekeeping*, utilizando-se a equação matemática $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*fold change*).

3.2.6. 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 uL 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*fold change*).

Os microRNAs 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 microRNAs estudados foram escolhidos por estudo de bioinformática de acordo com genes relacionados à apoptose 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>.

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

Para testar o perfil de resistência das células dos pacientes a apoptose celular, as células mononucleares de 15 pacientes foram plaqueadas na concentração de 10^6 células/poço em placas de 24 poços. Os linfócitos foram ativados com $2\mu\text{g}$ de fitohemaglutinina (Sigma[®], St Louis, Missouri, EUA), durante três dias e, a seguir, expostos aos seguintes agentes apoptogênicos: $1\mu\text{M}$ e $5\mu\text{M}$ de Actinomicina (ACT-D) (Sigma[®], St Louis, Missouri, EUA), $50\mu\text{M}$ de Cicloheximida (CHX) (Sigma[®], St Louis, Missouri, EUA), $25\mu\text{M}$ de Etoposídeo (VP16) (Bristol-Meyers-Squibb[®], Sermoneta, Latina, Italy), $25\mu\text{M}$ de Teneposídeo (VM26) (Bristol-Meyers-Squibb[®], Sermoneta, Latina, Italy), $25\mu\text{M}$ de Citarabina (ARA-C) (Pfizer[®], Nerviano, Milão, Italy) e $1\mu\text{M}$ e $5\mu\text{M}$ 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 pelo método 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 por 20 min e em seguida na presença de iodeto de propídio (PI) analisadas quanto à emissão de luz pelos fluorocromos no citômetro de fluxo (FACSCanto, BD, San Jose, Califórnia, EUA). Foram adquiridos dez mil eventos, a *gate* realizada na população de células mononucleares, considerando-se tamanho e complexidade. Os resultados foram analisados por dot-plot e expressos pela percentagem de células marcadas. 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.

3.2.8. Detecção de proteínas pró e anti-apoptóticas por *Western Blot*

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando-se o kit BCATM Protein Assay de acordo com instruções do fabricante (Pierce, Rockford, Illinois, EUA). As proteínas (30 ug) foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 8%, por 2 horas a 100 volts, e transferidas para membrana de PVDF, a 0.30 mA por duas horas. As membranas de Western-blot foram bloqueadas em tampão TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) -0,1% Tween (Sigma, St Louis, Missouri, USA) com 5% de leite desnatado adicionado de 0,01% de azida sódica, por 3 horas à temperatura ambiente (TA) e subsequentemente incubadas com os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal de camundongo anti-BCL2 humano (cod 551109, BD Pharmigen®, San Diego Califórnia, EUA) anticorpo monoclonal de camundongo anti-Bax (cod 556467 , BD Pharmigen®, San Diego Califórnia, EUA). Esses anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio 0,01% de azida, anti-BCL2 humano na diluição 1:1000 e anti-Bax na diluição 1:500 e incubados *overnight*. Após 1 lavagem de 15 minutos e 3 lavagens de 5 minutos, os *blots* foram incubados com anticorpos secundários conjugados à peroxidase (GE-Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK) na diluição 1: 2000 em

solução TBS-0,1%Tween com 5% de leite desnatado. 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).

3.2.9. Análise Estatística

A comparação dos dados de expressão, de microRNAs e dos genes alvo envolvidos na apoptose, entre os pacientes com policitemia vera e controles foi realizada pelo teste estatístico de Mann-Whitney. A correlação entre os dados clínico-laboratoriais e a expressão de miRNAs e entre os dados de expressão dos genes alvo envolvidos na apoptose dos pacientes e dos microRNAs foi determinada pelo teste de Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p for menor do que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da pureza das células CD34⁺ por citometria de fluxo

A pureza das células CD34⁺ obtidas da medula óssea de pacientes com Policitemia Vera foi em média de 84,04% (mediana: 91,77; faixa: 62,64% a 99,5%). O volume de amostra obtido dos pacientes 01 e 19 não foi suficiente para obtenção de número adequado de células CD34⁺ para realização da citometria de fluxo. Por essa mesma razão não foi possível quantificar a pureza das células CD34⁺ dos controles 12, 16 e 17.

O número de células CD34⁺ e a pureza obtidos dos pacientes de PV e do grupo controle estão listados nas tabelas 6 e 7.

4.2. Detecção da mutação JAK2 V617F em leucócitos de sangue periférico e porcentagem de alelos mutados

Foram analisadas 30 amostras de pacientes com Policitemia Vera, das quais 24 foram positivos para a mutação em diferentes porcentagens de alelos mutados (Tabela 8). A porcentagem de alelos mutados do paciente PV18 não pode ser calculada por inadequação da amostra.

Tabela 6 - Número de células CD34⁺ coletadas de pacientes com Policitemia Vera e porcentagem de pureza.

Amostras	Nº de células CD34⁺	Pureza (%)
PV 01	3,25x10 ⁵	ND
PV02	7,5x10 ⁵	91,69
PV03	2x10 ⁶	87,24
PV 04	4x10 ⁵	91,77
PV 05	1x10 ⁶	62,64
PV 06	4,8x10 ⁵	94,86
PV 07	1,62x10 ⁶	96,37
PV 08	5,2x10 ⁵	90,55
PV 09	4,4x10 ⁵	91,84
PV 10	6,8x10 ⁵	76,57
PV 11	3,37x10 ⁵	93,13
PV 12	4,8x10 ⁵	97,10
PV 13	1,3x10 ⁶	94,96
PV 14	3,75x10 ⁵	71,7
PV 15	1x10 ⁶	96,00
PV 16	1,84x10 ⁷	76,00
PV 17	2,2x10 ⁵	84,00
PV 18	5,25x10 ⁶	99,50
PV 19	5,4x10 ⁴	ND
PV 20	3,2x10 ⁵	98,00
PV21	1,4x10 ⁵	73,00
PV22	3x10 ⁵	98,00
PV23	1,52x10 ⁶	96,00
PV24	7,5x10 ⁵	98,00
PV25	1x10 ⁵	ND
PV26	1,5x10 ⁵	75,00
PV27	1x10 ⁶	68,00
PV28	1,5x10 ⁵	91,00
PV29	2,75x10 ⁴	ND
PV30	1,8x10 ⁶	96,7

PV: Policitemia Vera; ND: não determinado

Tabela 7 - Número de células CD34⁺ coletadas do grupo controle e porcentagem de pureza.

Amostra	Nº células CD34⁺	Pureza (%)
MOC 01	1,3 x10 ⁵	80,70
MOC02	2,0 x10 ⁶	80,22
MOC03	7,5 x10 ⁵	97,46
MOC 04	2,0 x10 ⁶	95,79
MOC 05	6,0 x10 ⁵	87,43
MOC 06	3,75 x10 ⁶	88,83
MOC 07	8,5 x10 ⁵	90,40
MOC 08	3,51 x10 ⁵	91,05
MOC 09	5,0 x10 ⁴	88,19
MOC 10	3,5 x10 ⁶	90
MOC 11	5,5 x10 ⁵	97,30
MOC 12	2,55 x10 ⁶	****
MOC 13	1,9 x10 ⁶	92
MOC 14	2,0 x10 ⁶	90,30
MOC 15	8,0 x10 ⁵	92,7
MOC 16	4,0 x10 ⁵	88
MOC 17	3,15 x10 ⁶	92
MOC 18	1,0 x10 ⁶	82
MOC 19	4,5 x10 ⁶	83
MOC 20	9,0 x10 ⁵	86
MOC 21	2,2 x10 ⁶	95
MOC 22	5,3 x10 ⁶	91
MOC 23	3,0 x10 ⁵	75

**** amostra utilizada em ensaio de apoptose, não foi detectada sua pureza.

Tabela 8 - Detecção da mutação JAK2V617F e porcentagem de alelos mutados em pacientes com Policitemia Vera.

Amostras	Mutação JAK2 V617F	Alelos mutados (%)
PV 01	(-)	(-)
PV02	+	13
PV03	+	90
PV 04	+	13
PV 05	+	87
PV 06	+	25
PV 07	+	52
PV 08	+	50
PV 09	+	40
PV 10	+	94
PV 11	(-)	(-)
PV 12	+	55
PV 13	(-)	(-)
PV 14	+	77,8
PV 15	+	57,5
PV 16	(-)	(-)
PV 17	+	57,9
PV 18	+	ND
PV 19	+	45,9
PV 20	+	56,5
PV21	+	70
PV22	+	31,3
PV23	(-)	(-)
PV24	+	21,6
PV25	+	34,4
PV26	(-)	(-)
PV27	+	70,3
PV28	+	30,4
PV29	+	93
PV30	+	68,8

PV: Policitemia Vera; ND: não determinado

4.3. Parâmetros hematológicos das amostras de sangue periférico dos pacientes com Policitemia Vera

O hemograma do sangue periférico dos pacientes foi realizado na mesma data de e processamento da amostra coletada. Os resultados dos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, leucócitos e plaquetas) empregados nas análises de correlação estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Hematócrito, Hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas dos pacientes com Policitemia Vera.

Pacientes	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)
PV 01	57.9	19.1	8.08	207
PV02	48.3	16.9	5.2	247
PV03	44.5	15.9	8.8	541
PV 04	48.1	16.2	5.1	182
PV 05	40.0	12.1	20,0	568
PV 06	46.6	15.6	8.75	330
PV 07	49.4	15.3	7.47	275
PV 08	52.7	16.4	9.04	412
PV 09	49.4	17.2	8.20	302
PV 10	53.9	16,0	21.3	420
PV 11	53.5	17.4	5.5	229
PV 12	60.0	18.3	8.85	299
PV 13	49.3	15.9	8.8	234
PV 14	53.1	16.1	8.98	259
PV 15	49.1	16.6	8.97	181
PV 16	41.6	14.3	9.86	461
PV 17	55.7	17.3	6.82	483
PV 18	46.7	14,91	18.4	605
PV 19	36.7	11.5	3.59	664
PV 20	41.0	12.5	6.35	449
PV21	60.4	19.5	15.7	772
PV22	62.0	20.0	9.7	161
PV23	50.7	18.1	3.6	211
PV24	60.7	19.9	13.8	340
PV25	54.0	19.2	13.2	551
PV26	76.0	20.9	7.5	201
PV27	40.1	13.2	14.2	621
PV28	48.2	15.5	6.4	451
PV29	41.8	12.0	24.3	203
PV30	66.0	20.0	9.38	481

4.4. Expressão de miRNA em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV e controles

A análise dos níveis de expressão de microRNA foi realizada em 28 amostras de leucócitos de sangue periférico e 20 amostras de células CD34⁺ de pacientes pareadas (gênero, idade e cor) com seus respectivos controles. Parte das amostras de pacientes analisadas pertence ao banco de amostras do nosso grupo de pesquisa e por esta razão 2 delas não apresentaram quantidade suficiente de RNA para realização dos experimentos. Essa informação justifica a diferença entre o número de amostras analisadas de sangue periférico e medula óssea.

Os microRNAs 29c (mediana=6,08), let-7d (m=5,43), 21 (m=6,97), 26a (m=9,36), 130b (m=12,77) e 16 (m= 3,45) estão *hiperexpressos* nos leucócitos dos pacientes quando comparados aos controles (medianas: 0,9825; 1,305; 0,9895; 1,15; 0,800; 0,4830; p= 0,0001; 0,0001; 0,0001; 0,0001; 0,0001 e 0,0001 respectivamente).

Os microRNAs 34c (m= 0,04) e 15a (m= 0,28) estão *hipoexpressos* nos pacientes com PV em relação aos controles (medianas = 0,21; m= 0,99 e p= 0,0203 e 0,0005, respectivamente). Não foi observada diferença de expressão do microRNAs 451 (m= 0,56) em pacientes em relação aos controles (mediana= 1,680 e p=0,156). Estes dados estão apresentados na figura 4.

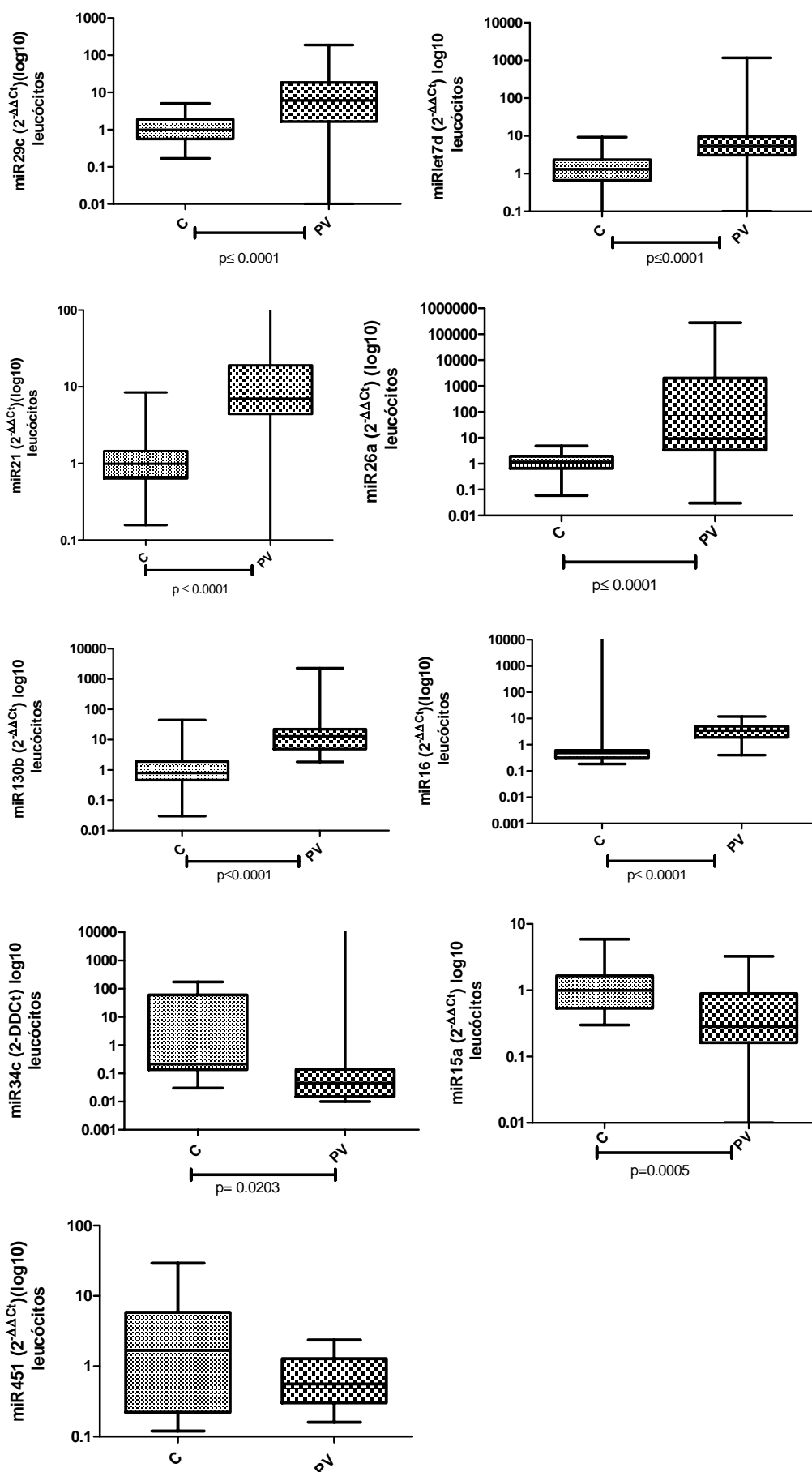


Figura 4: Expressão de microRNAs em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV. Os microRNAs 29c, let-7d, 21, 26a, 130b e 16 encontram-se hiperexpressos enquanto que os miR 34c e 15a *hipoexpressos* nos pacientes em relação aos controles.

4.5. Análise da Expressão de miRNAs em células CD34⁺ de medula óssea de pacientes com PV e controles

Os microRNAs 29c (m= 2,03); 16 (m= 3,86) e 21 (m=4,07) estão *hiperexpressos* nos pacientes em relação aos controles com medianas= 0,8690; 0,9788 e 1,15 e valores de p= 0,038; 0,0001; 0,0005, respectivamente.

Os microRNAs 130b (m= 0,38), let-7d (m=0,49) estão *hipoexpressos* nos pacientes com PV em relação aos controles (mediana= 1,16 e 1,48 e p= 0,0006; 0,0373, respectivamente). Não foi observada diferença significativa na expressão do microRNA 15a e 26a em células CD34⁺ de pacientes com PV (p= 0,305 e 0,099, respectivamente) (Figura 5).

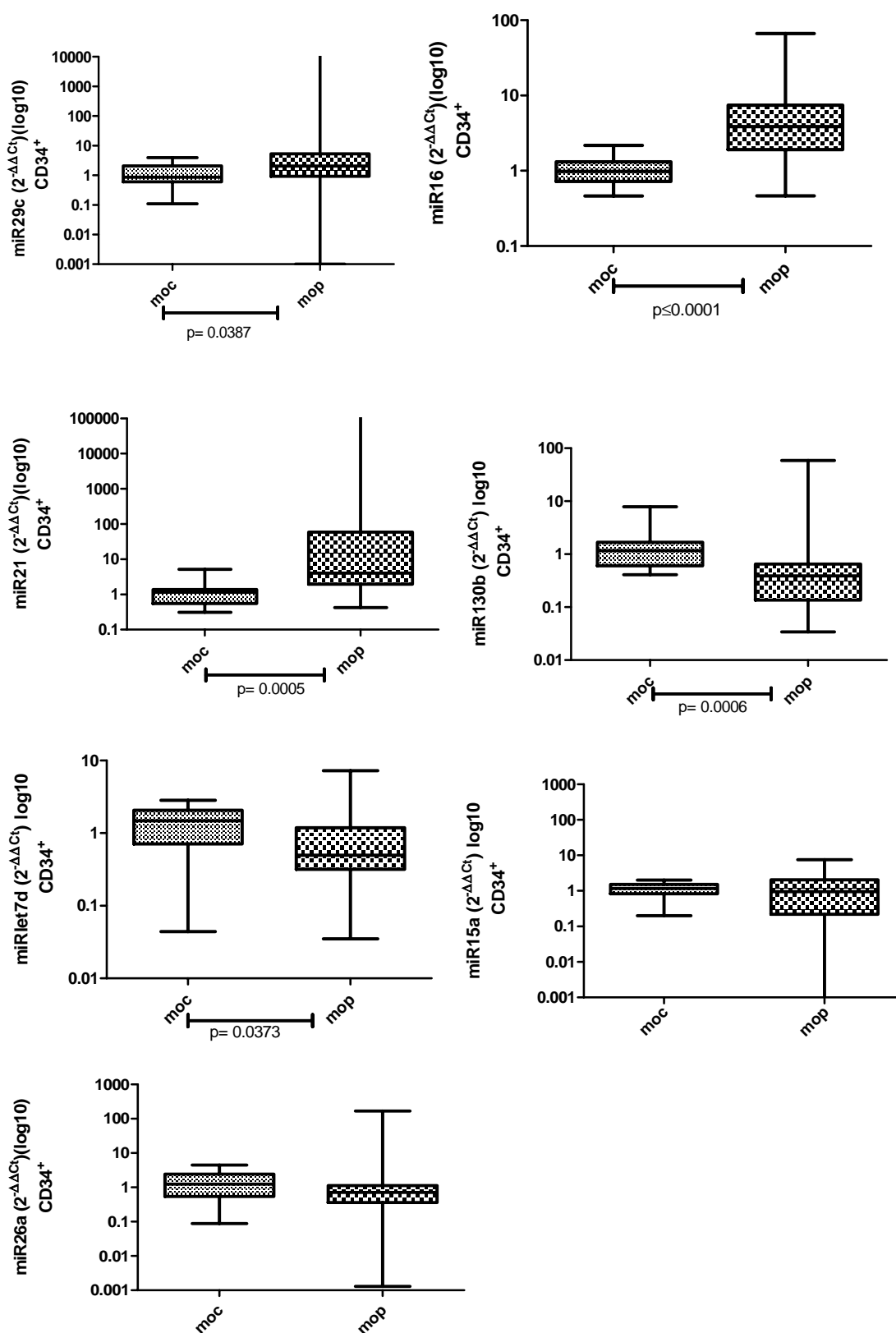


Figura 5: Expressão de microRNAs em células CD34⁺ de pacientes com Policitemia Vera e controles. Os microRNAs 29c, 16 e 21 encontram-se *hiperexpressos*, enquanto que os microRNAs 130b, let-7d encontram-se *hipoexpressos* nas células CD34⁺ dos pacientes em relação aos controles

4.6. Análise da expressão de genes pró-apoptóticos envolvidos na apoptose, alvos dos microRNAs analisados

4.6.1. Expressão gênica em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV

A quantificação dos níveis de expressão dos genes pró-apoptóticos foi realizada em 29 amostras de leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV e 29 indivíduos controle.

Foram analisados os genes da família Bcl-2, *bid*, *bik*, *bax*, reguladores da via intrínseca da apoptose e os genes, *fas* e *fas-L* da via extrínseca da apoptose (Figura 6).

Podemos observar a diminuição na expressão do gene pro-apoptótico *bax* ($m= 0,27$) e *fas-L* ($m=0,06$) em relação ao grupo controle ($m= 1,06$ e $m= 3,670$; $p= 0,0009$ e $0,0001$, respectivamente). Não houve diferença significativa na expressão dos genes *fas*, *bid* e *bik* em pacientes com PV em relação ao grupo controle ($p= 0,1065$; $0,4219$; $0,2482$, respectivamente).

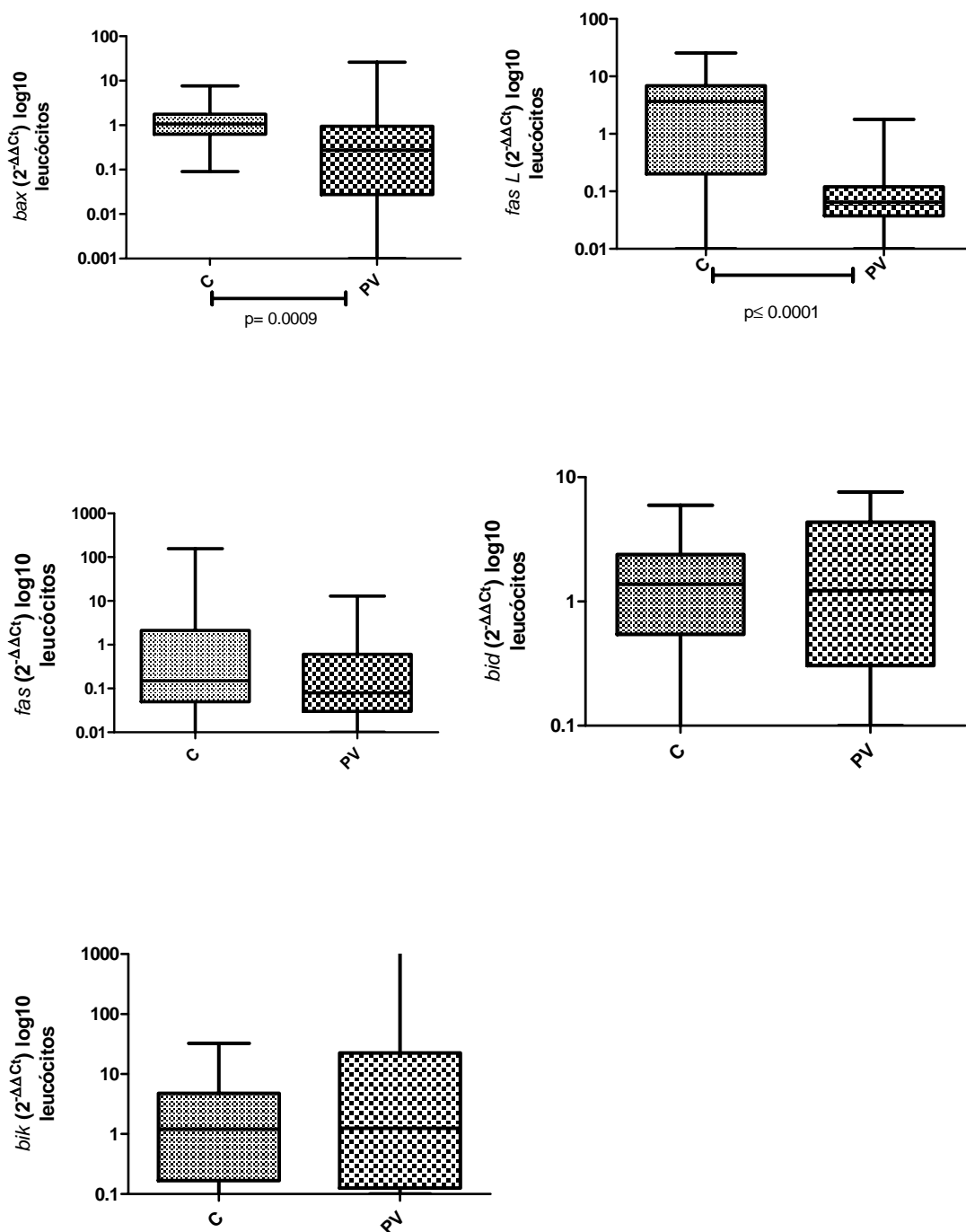


Figura 6: Expressão de genes pró-apoptóticos em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera. Houve diferença na expressão do gene *bax* e *fas-L* e não se observou diferença na expressão dos genes *fas*, *bid* e *bik* ($p > 0,05$).

4.6.2. Quantificação da expressão gênica dos alvos dos apoptomirs em células CD34⁺ de pacientes com PV e controles

Os genes pró- apoptóticos *bid*, *bik*, *bax* e *fas* foram analisados em 27 amostras de medula óssea de pacientes com PV e 18 amostras de controles.

A expressão dos genes pró-apoptóticos *bid* e *fas* (m= 83,78 e 38,36, respectivamente) apresenta-se aumentada em células CD34⁺ de pacientes em relação aos controles (m=7,67; 8,554 e p= 0,005; 0,0007, respectivamente). A expressão do gene pró-apoptótico *bik* (m= 0,0015) está diminuída em relação aos controles (m=0,3538 e p= 0,0008). Não houve diferença de expressão de *bax* (p= 0,235) entre pacientes e controles (Figura 7).

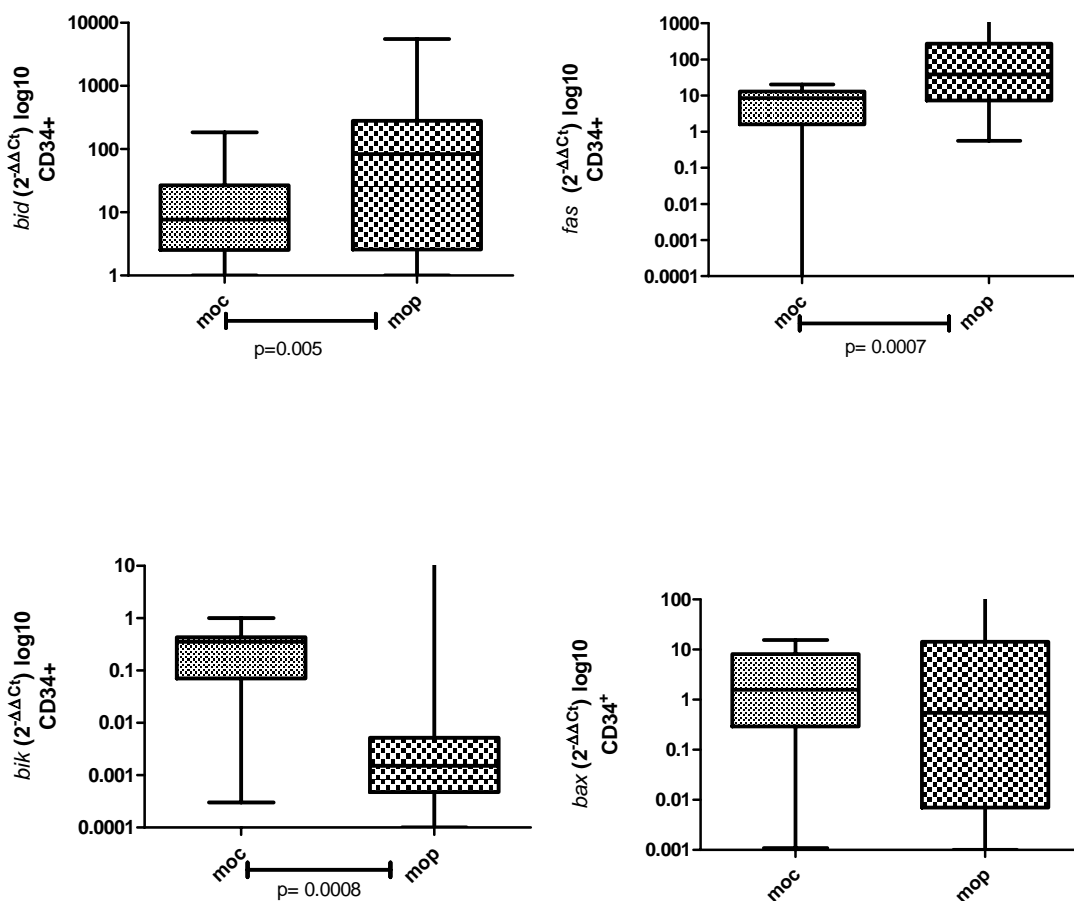


Figura 7: Expressão de genes pró-apoptóticos em células CD34+ de pacientes com PV. Houve hiperexpressão dos pró-apoptóticos *bid* e *fas* e hipoexpressão de *bik*. Não se observou diferença significativa nos níveis de expressão do gene *bax* em relação aos controles ($p > 0,05$).

4.7. Expressão de genes anti-apoptóticos alvos dos microRNAs analisados

4.7.1. Quantificação da expressão dos genes anti-apoptóticos alvos dos apoptomirs no sangue periférico de pacientes e controles

A expressão dos genes *al* e *mcl-1* está aumentada (m= 5,43 e 1,99, respectivamente) em comparação com os controles (m= 0,53 e 0,825, respectivamente) (p= 0,0008 e 0,0273 respectivamente) e *bcl-2* e *ciap-2* diminuída (m= 0,18 e 0,135 respectivamente) nos pacientes em relação aos controles (m= 1,03 e 0,560; p= 0,019 e 0,0143 respectivamente). Não observamos diferenças nos níveis de expressão dos genes *bcl-xL* e *c-flip* em relação aos controles (p= 0,2459; 0,4535 respectivamente) conforme visto na figura 8.

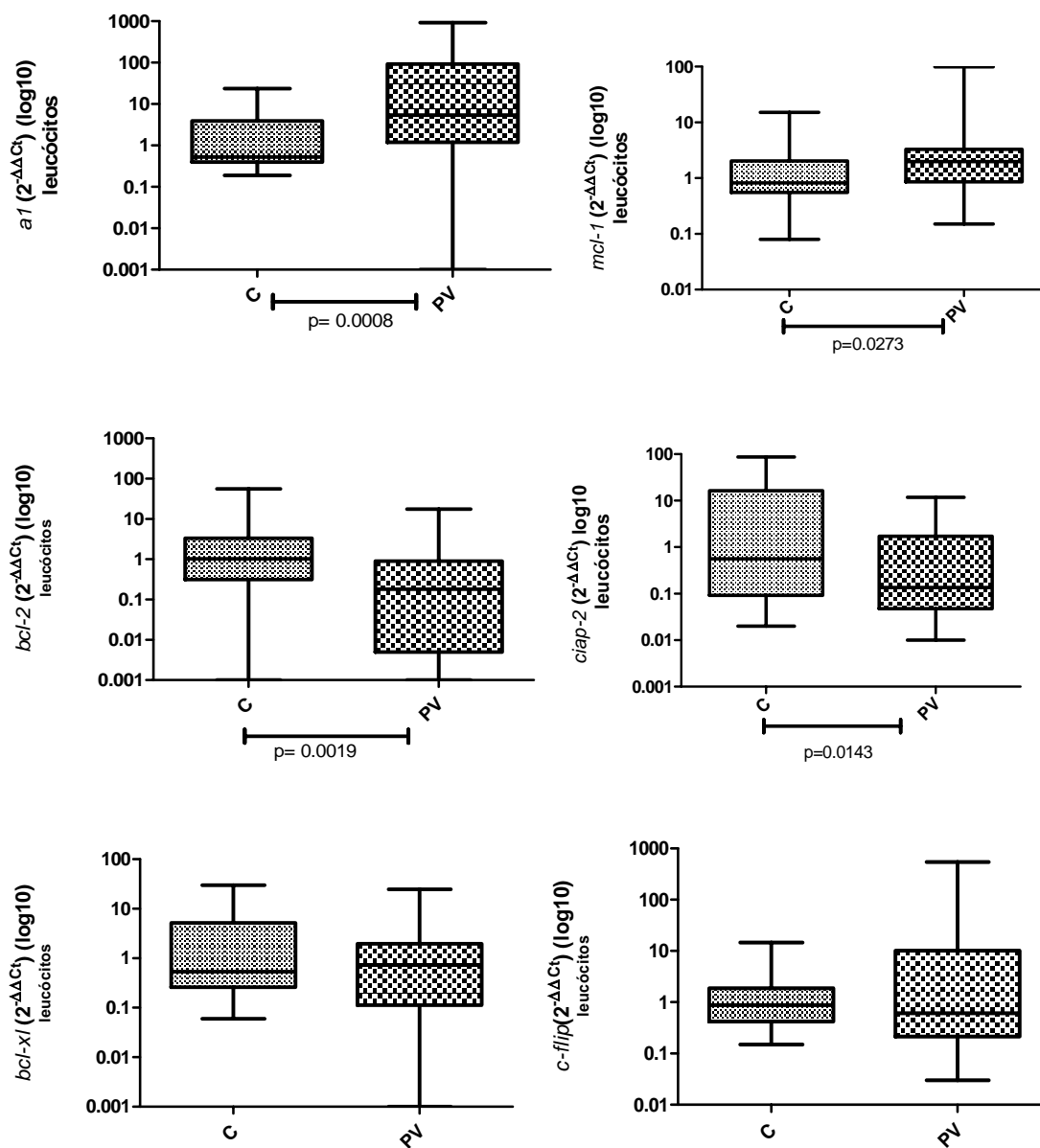


Figura 8: Expressão de genes anti-apoptóticos em leucócitos de sangue periférico de pacientes com PV. Expressão dos anti-apoptóticos *bcl-2* e *ciap-2* diminuída, *a1* e *mcl-1* aumentada e expressão dos genes *bcl-xl*, e *c-flip* sem diferenças significativas em relação aos controles ($p > 0,05$).

4.7.2. Quantificação dos níveis de expressão gênica em células CD34⁺ em comparação ao grupo controle

Observamos na figura 9 que houve aumento da expressão de *mcl-1*, *bcl-xl* e *c-flip* (m= 8,007; 22,16 e 24,40) em CD34⁺ de pacientes com PV quando comparado ao grupo controle (m= 1,709; 9,122 e 2,175; p = 0.003; 0,026 e 0,001, respectivamente). Os demais genes analisados *a1*, *bcl-2* e *ciap-2* não apresentaram diferenças significativas quanto aos níveis de expressão em comparação ao grupo controle (p= 0.084; 0.144 e 0,100, respectivamente).

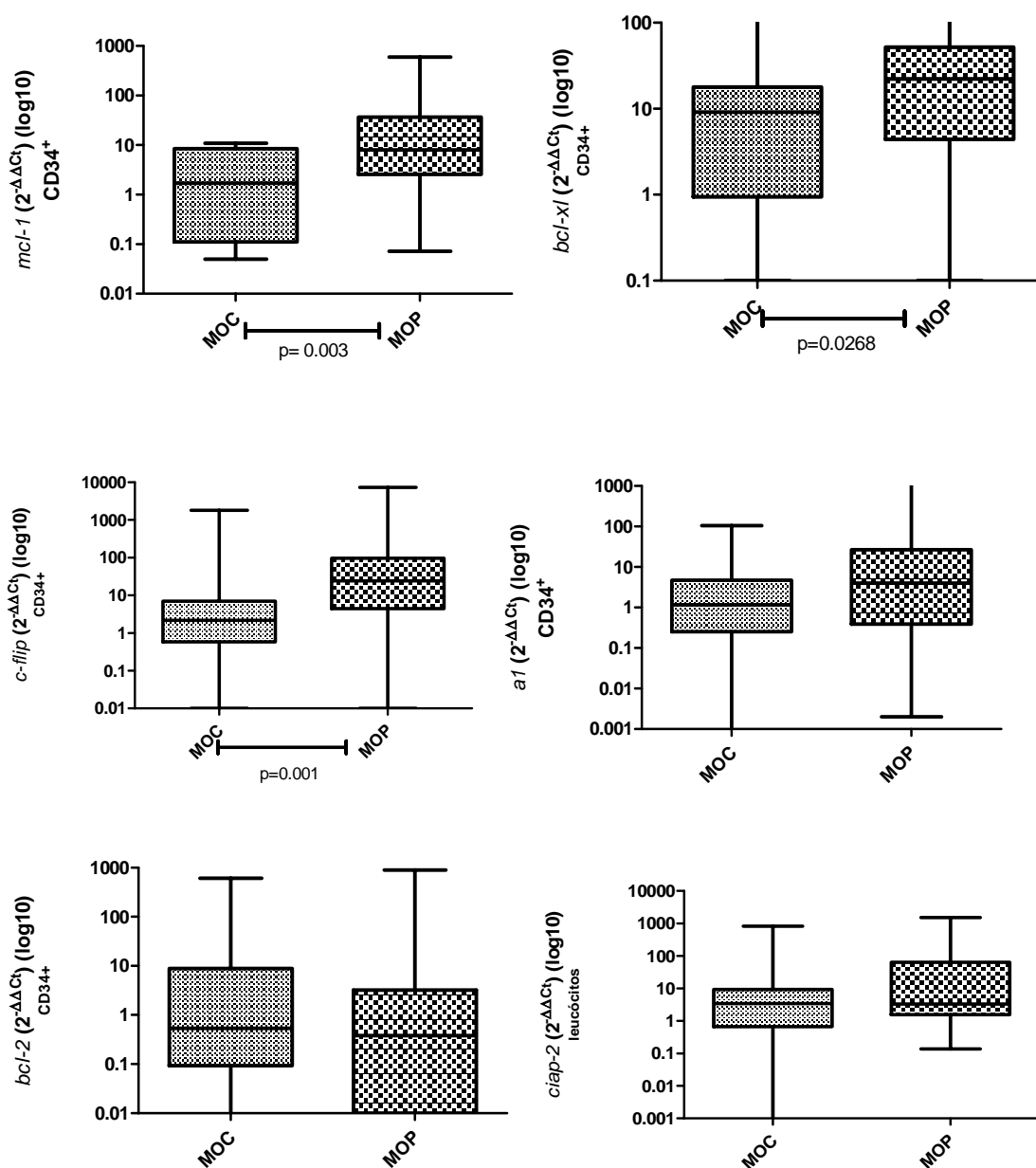


Figura 9: Expressão de genes anti-apoptóticos em células CD34⁺ de pacientes com PV e controles. A expressão dos genes *mcl-1*, *bcl-xL* e *c-flip* está elevada nos pacientes em comparação aos controles. Não houve diferenças significativas na expressão dos genes *a1*, *ciap-2* e *bcl-2* ($p > 0,05$) entre células dos pacientes e controles.

O resumo dos resultados dos níveis de expressão dos apoptomiRs e genes envolvidos na apoptose obtidos nos pacientes em relação aos controles estão relatados nas tabelas 1 e 2 do apêndice 1.

4.8. Correlação dos níveis de expressão dos apoptomirs com a expressão de genes alvos em pacientes com PV

4.8.1. Em leucócitos do sangue periférico

A figura 10 mostra as correlações positivas entre: *bcl-2* e *mir-16*, *mcl-1* e *mir-29c*, *fas-L* e *mir let-7d* e *ciap-2* e *mir-130b*; miRs *let-7d* e o anti-apoptótico *fas* ($r=0,438$); *mir-16* e o anti-apoptótico *bcl-2* ($r=0,358$); *mir-29c* e anti-apoptótico *mcl-1* ($r=0,609$) e *mir-130b* e o anti-apoptótico *ciap-2* ($r=0,488$) ($p=0,009$; $0,033$; $0,013$ e $0,004$, respectivamente).

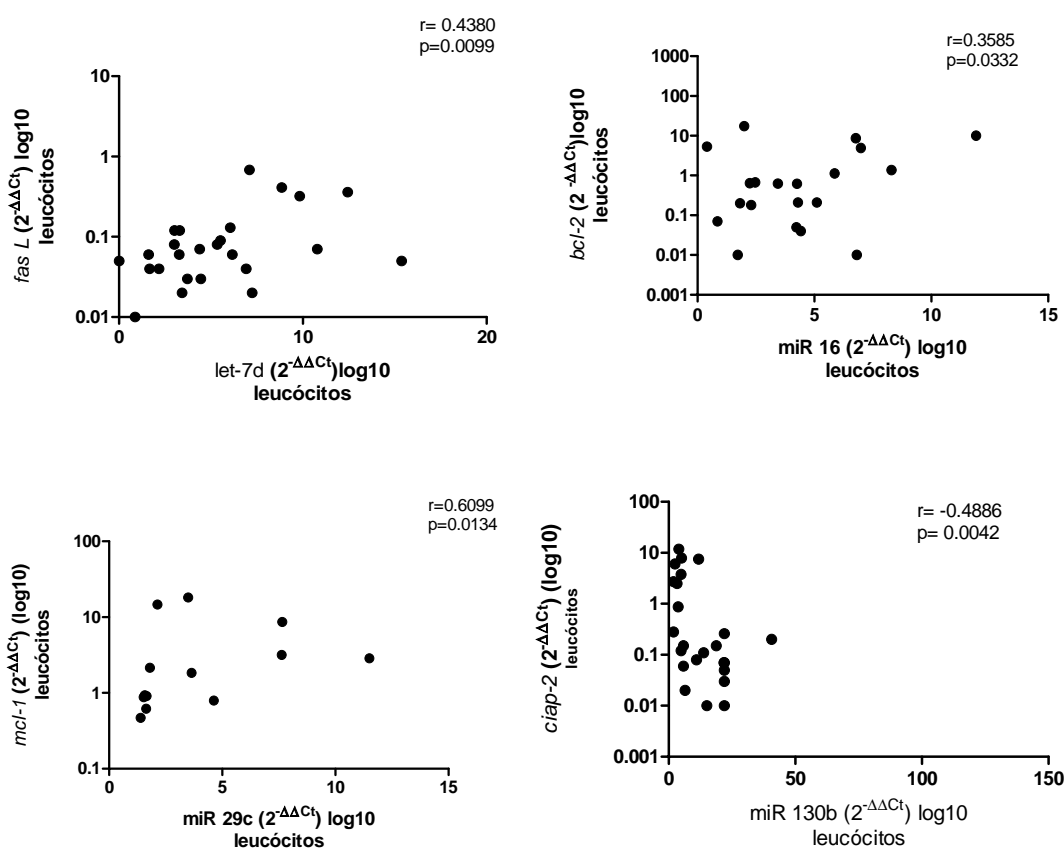


Figura 10: Correlação entre os valores de expressão dos microRNAs e a expressão dos genes alvos em leucócitos dos pacientes com PV

4.8.2. Em células CD34⁺ de pacientes

A figura 11 mostra as correlações com diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão dos microRNAs e seus respectivos genes anti-apoptóticos alvo. Houve correlações negativas entre miR21 e o anti-apoptótico *bcl-2* ($r = -0,417$); o mir-16 e o anti-apoptótico *bcl-2* ($r = -0,384$); mir-16 e anti-apoptótico *bid* ($r = -0,387$) e mir-130b e o anti-apoptótico *ciap-2* ($r = -0,490$) ($p = 0,033$; $0,046$; $0,045$ e $0,037$, respectivamente).

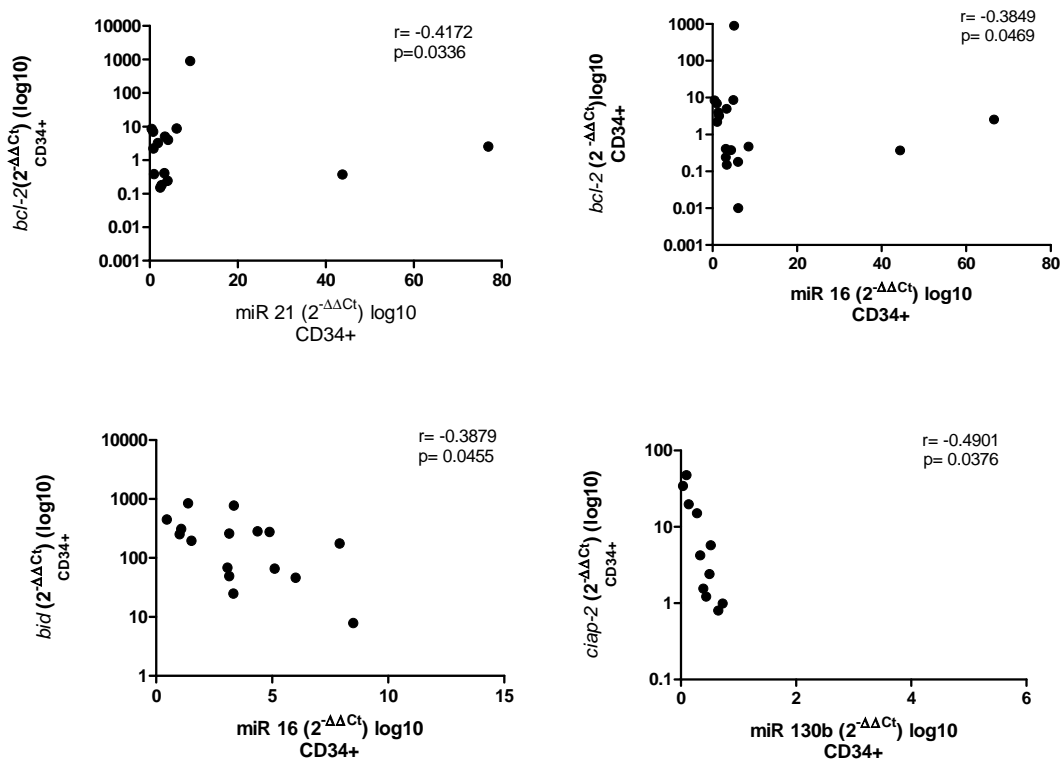


Figura 11: Correlação entre os valores de expressão dos microRNAs e a expressão dos genes alvos em células CD34⁺ de pacientes com PV.

4.9. Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão dos microRNAs

4.9.1. Em leucócitos de pacientes com PV

Observamos na figura 12 correlação positiva entre a porcentagem de alelos mutados e a expressão de miR16 ($r= 0,516$ e $p= 0,0035$) e correlação negativa entre os níveis de hematócrito e hemoglobina e os níveis de miR 16, em leucócitos de pacientes ($r= -0,379$ e $0,398$; $p= 0,025$ e $0,019$, respectivamente).

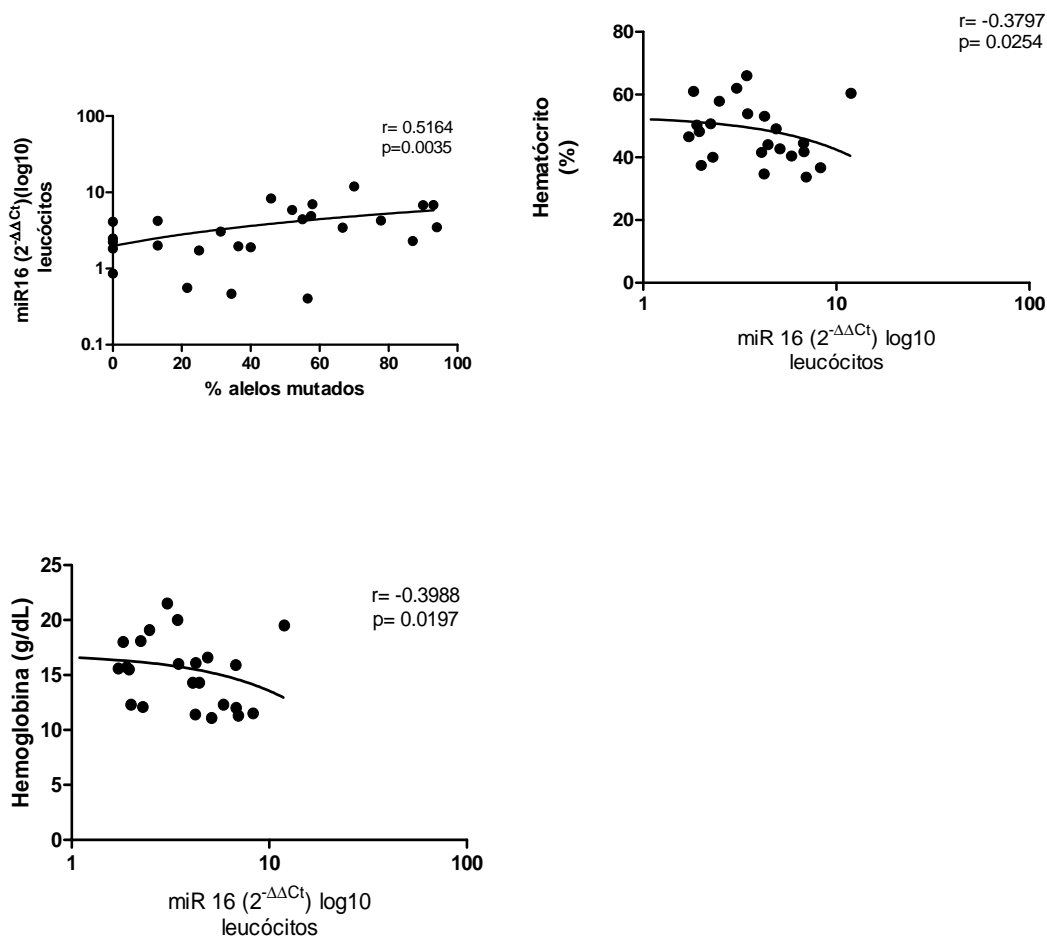


Figura 12: Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão de microRNAs em leucócitos de pacientes com PV.

4.9.2. Em células CD34⁺ de pacientes com PV

Na figura 13 observamos correlação positiva entre os níveis de hematócrito e a expressão de miR29c ($r = -0,4142$ e $p = 0,049$) e entre os níveis de hematócrito e hemoglobina e o expressão de miR 21, em células CD34⁺ de pacientes ($r = 0,394$ e $,4701$; $p = 0,0428$ e $0,0182$, respectivamente).

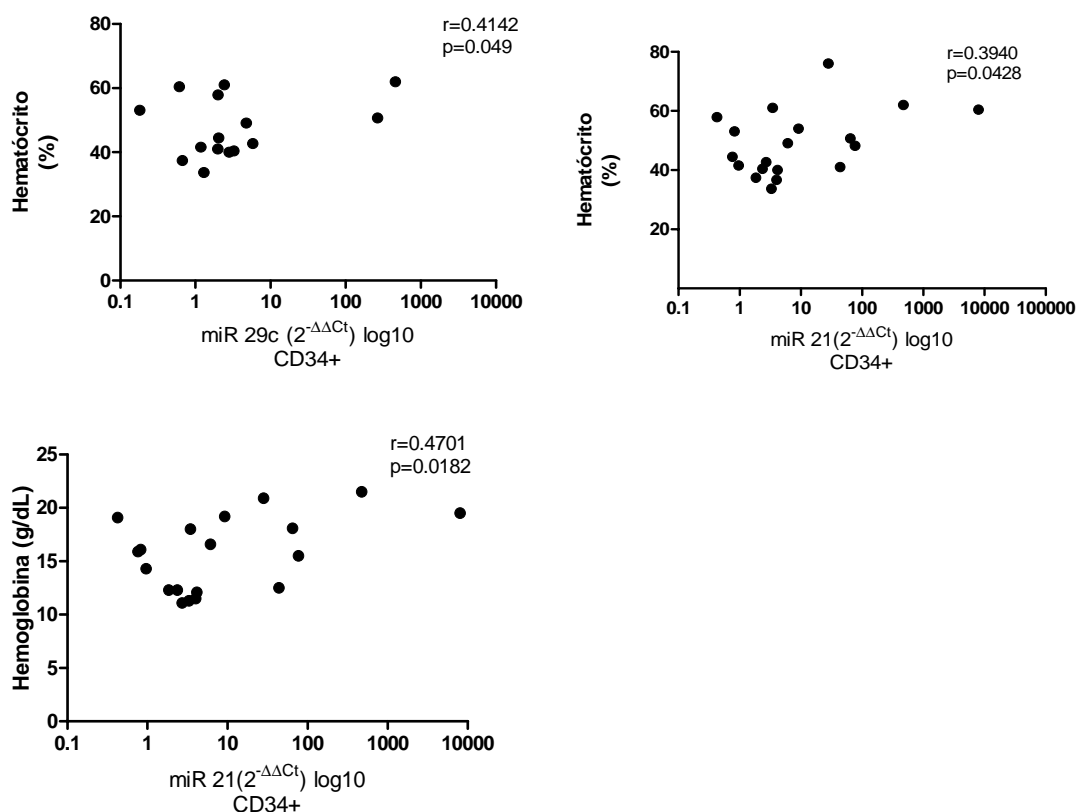


Figura 13: Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão de microRNAs em células CD34⁺ de pacientes com PV.

4.10. Correlação dos níveis de expressão dos genes reguladores da apoptose com parâmetros hematológicos

4.10.1. Em leucócitos de pacientes com PV

A figura 14 indica em leucócitos de pacientes, as correlações negativas detectadas entre a expressão do gene anti-apoptótico *al* e a porcentagem de hematócrito e concentração de hemoglobina ($r = -0,4368$; $-0,4921$ e $p = 0,0089$; $0,0033$, respectivamente); entre a expressão do anti-apoptótico *c-flip* e a porcentagem de hematócrito e concentração de hemoglobina ($r = -0,3228$; $-0,3580$ e $p = 0,0469$; $0,0307$, respectivamente); entre a expressão do anti-apoptótico *ciap-2* e a porcentagem de hematócrito e concentração de hemoglobina ($r = -0,3242$; $0,3455$ e $p = 0,0402$ e $0,0308$, respectivamente); entre a expressão do anti-apoptótico *bcl-x_L* e a porcentagem de hematócrito ($r = -0,3104$ e $p = 0,0475$).

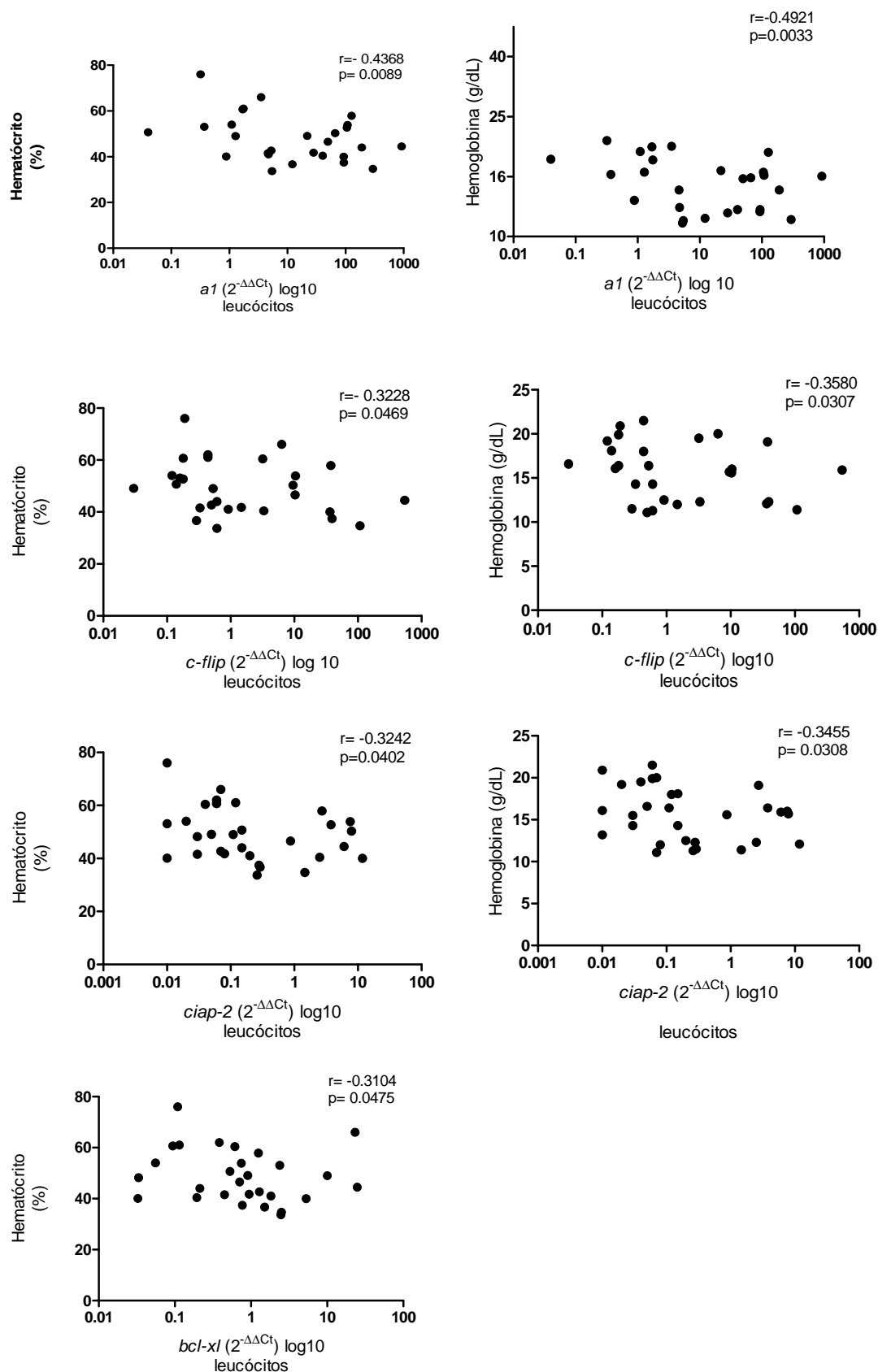


Figura 14: Correlação dos parâmetros hematológicos com os níveis de expressão gênica em leucócitos de pacientes com PV.

4.10.2. Em células CD34⁺ de pacientes com PV

Observamos correlação negativa entre a porcentagem de hematócrito e a concentração de hemoglobina e a expressão do anti-apoptótico *ciap-2*, em células CD34⁺ de pacientes ($r = -0,4794$; $-0,3564$ e $p = 0,0066$ e $0,0369$, respectivamente) (Figura 15).

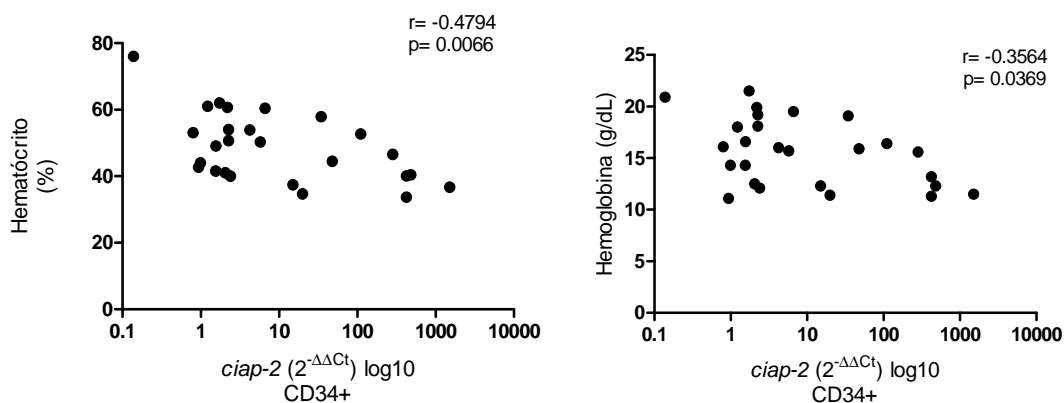


Figura 15: Correlação da concentração da hemoglobina e do hematócrito com os níveis de expressão do *ciap-2* em células CD34⁺ de pacientes com PV.

O resumo dos resultados das correlações realizadas nesse estudo estão relatados na tabela 3 do apêndice 1.

4.11. Análise da porcentagem de linfócitos dos pacientes resistentes à apoptose

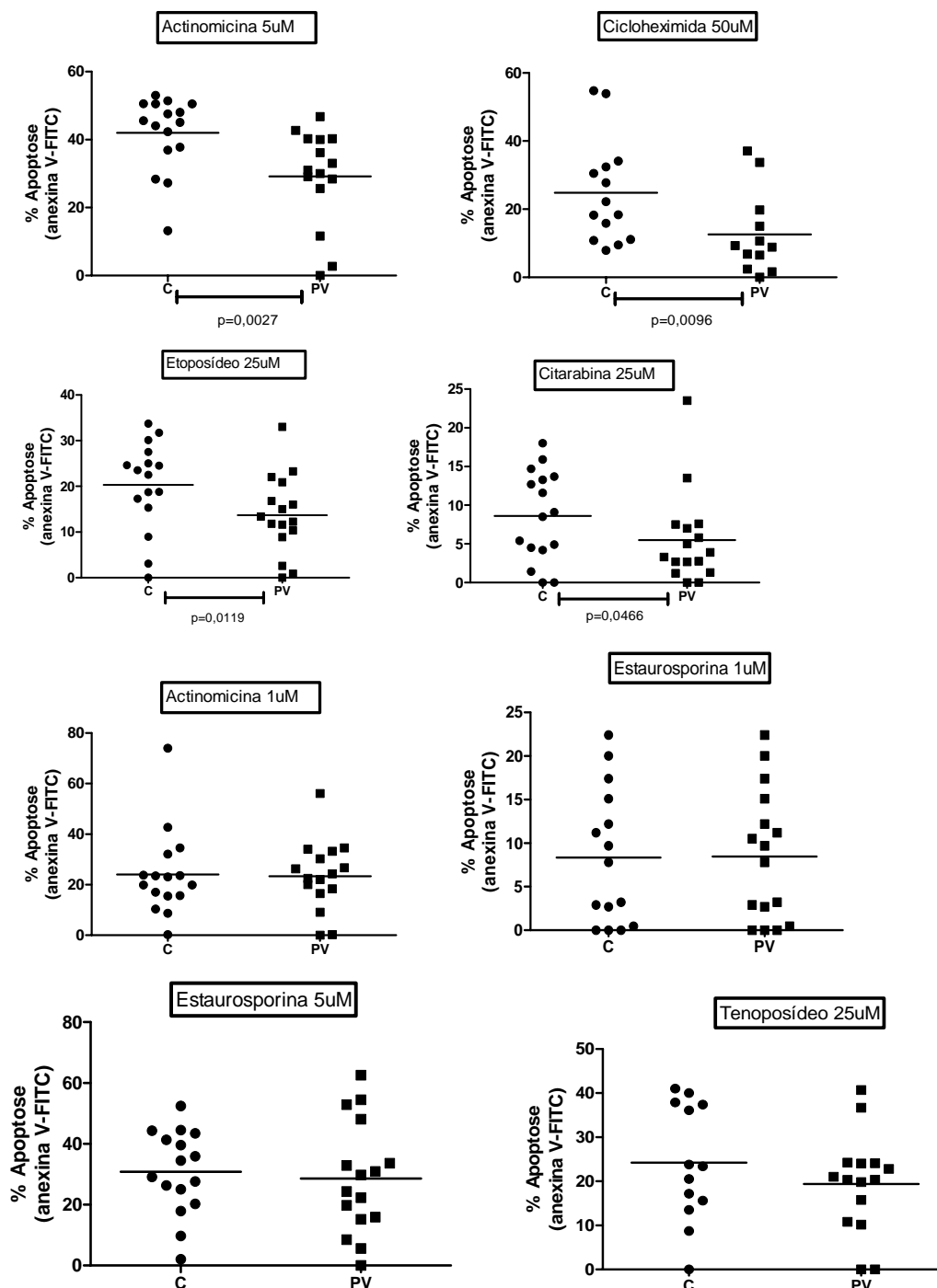
A mediana da porcentagem de apoptose dos linfócitos de sangue periférico de pacientes com PV e indivíduos controle induzida pelas drogas apoptogênicas: actinomicina-D, cicloheximida, etoposídeo, tenoposídeo, citarabina, estaurosporina está descrita na tabela 10.

A porcentagem de apoptose das células de pacientes foi estatisticamente significativa para os seguintes indutores utilizados, Actinomicina 5uM, Cicloheximida 50uM, Etoposídeo 25uM e Citarabina 25uM, porém menor do que a porcentagem observada nas células do grupo controle como mostrado na figura 16.

Tabela 10 - Medianas das porcentagens de apoptose dos linfócitos dos grupos controle e pacientes com PV.

	ACT 1uM	ACT 5uM	CHX 50uM	VP16 25uM	ARA-C 25uM	STS 1Um	STS 5uM	VM26 25uM
Controle	34,25	45,35	20,3	23,01	8,8	8,75	31,8	23,4
PV	23,40	31,0	9,1	12,82	3,6	6,58	27,05	20,34

ACT: Actinomicina; CHX: Cicloheximida; VP16: Etoposídeo; ARA-C: Citarabina; STS: Estaurosporina; VM26: Tenoposídeo

**Figura 16: Porcentagem de linfócitos em apoptose, marcados com anexina V-FITC, em pacientes com PV e controles.**

4.12. Análise da expressão protéica em leucócitos do sangue periférico por *Western Blot*

A detecção das proteínas pró-apoptótica Bax e anti-apoptótica Bcl-2 foi realizada em leucócitos de pacientes com PV e indivíduos controle. A expressão da proteína BCL-2 em leucócitos de pacientes com PV apresentou-se menor em relação aos controles. Este resultado foi confirmado pelo cálculo da IDV para cada amostra e a razão da mediana dos IDV entre pacientes e controles encontrada foi de 0,5.

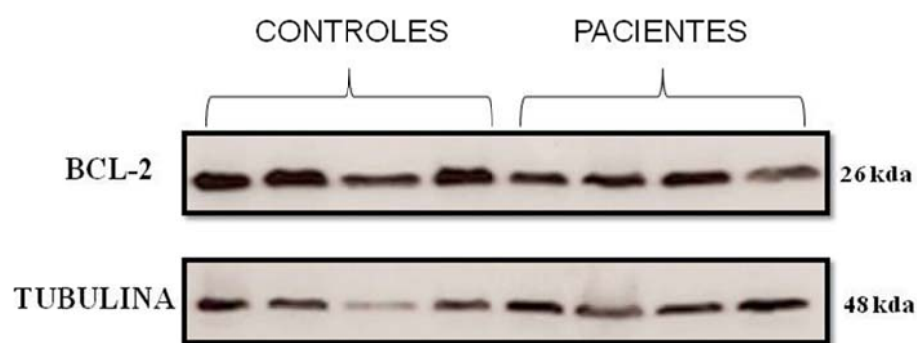


Figura 17: Detecção da proteína BCL-2 em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera.

A expressão da proteína BAX em leucócitos de pacientes com PV não apresentou alteração significativa nos pacientes com relação aos controles. Este resultado foi confirmado pelo cálculo da IDV para cada amostra e a razão da mediana dos IDV entre pacientes e controles encontrada foi de 1,16.

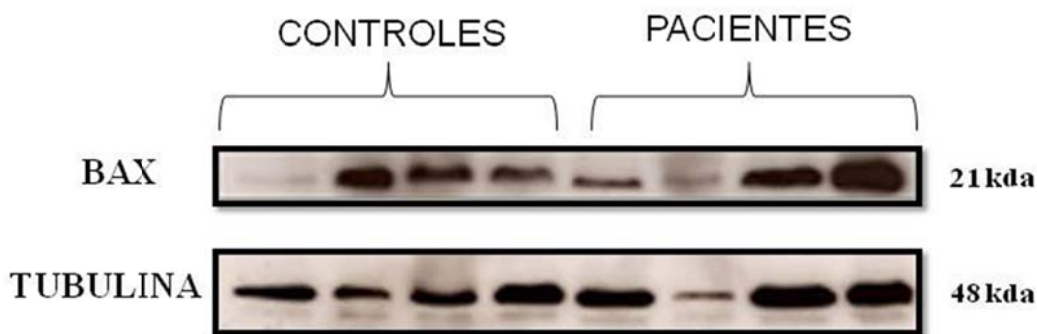


Figura 18: Detecção da proteína BAX em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera

5. DISCUSSÃO

A Policitemia Vera é uma doença hematológica de origem clonal classificada como uma Neoplasia Mieloproliferativa Crônica Clássica (NMPC), cromossomo Ph negativa. Caracteriza-se pela proliferação exacerbada de células da linhagem mielóide, com destaque para o acúmulo de eritrócitos com preservação de sua morfologia e função celulares (SPIVAK, 2002).

Na última década, a descoberta da mutação JAK2V617F, trouxe novos enfoques para os estudos relacionados ao entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia das NMPCs. A mutação V617F acarreta a ativação constitutiva da enzima JAK2 e das vias JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK, RAS que participam de diversos processos biológicos vitais, dentre eles proliferação e morte celular (JAMES *et al*, 2005).

Apesar desses achados promissores sobre a associação da patogênese da PV com as mutações JAK2 V617F (exon 14), exon 12 e MPL, 5% dos pacientes com PV são negativos para a mutação no exon 14 e esses achados não são suficientes para explicar toda a fisiopatologia da doença o que indica que outros mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos na fisiopatologia da PV e precisam ser descritos.

Neste sentido, o presente trabalho contribuiu com a quantificação da expressão de microRNAs em leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺ de pacientes com Policitemia Vera. Os microRNAs selecionados apresentam como alvos genes envolvidos na regulação da maquinaria apoptótica o que pode estar associado a fisiopatologia da PV. Desde a descoberta da família BCL-2 e a descrição de seu envolvimento na preservação da integridade da membrana mitocondrial, através do balanço entre as concentrações de moléculas pró e anti-apoptóticas presentes na membrana mitocondrial, associa-se as desregulações na maquinaria apoptótica a processos neoplásicos e tumorigênicos (BRENNER; MAK, 2009).

A modulação das funções celulares pela ação de microRNAs é um processo pouco elucidado em Policitemia Vera, contudo os relatos da participação destas moléculas na desregulação do processo apoptótico sugere sua participação no fenótipo de resistência das células a resposta imune ou a terapias, como demonstrado por Vecchione e Croce (2010), através da alteração da expressão de miR let-7a associada a supressão da indução de apoptose por drogas em células A431 e HepG2.

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram alterações na expressão de diferentes apoptomirs em leucócitos e células CD34⁺ de pacientes com PV. Os microRNAs 29c, 16, let-7d, 21, 26a e 130b encontram-se *superexpressos* nas amostras de leucócitos de sangue periférico de pacientes e os microRNAs 34c e 15a *hipoexpressos*. A análise dos resultados em células CD34⁺ de pacientes apontou para a desregulação na expressão dos microRNAs 29c, let-7d, 21, 130b e 16. Os microRNAs 29c, 21 e 16 estão *hiperexpressos* e os microRNAs let-7d e 130b *hipoexpressos* em relação ao grupo controle.

Bruchova e colaboradores (2009) descreveram a participação de microRNAs na eritropoese de pacientes com Policitemia Vera, no processo de regulação da expressão de genes envolvidos na maturação e ciclo celular, o que nos permite especular que a desregulação na expressão dessas moléculas estaria associada também ao mieloacúmulo.

Somente a análise da expressão de microRNAs não é suficiente para apontarmos o envolvimento efetivo dessas moléculas no descontrole da apoptose e seu consequente envolvimento na fisiopatologia da PV, por este motivo a análise da expressão dos genes pró e anti-apoptóticos preditos como alvo dos microRNAs foi realizada paralelamente para possibilitar a avaliação da possível correlação entre a expressão dessas moléculas.

Na análise de expressão gênica em leucócitos de sangue periférico observa-se o aumento na expressão dos genes anti-apoptóticos *a1* e *mcl-1* alvos dos microRNAs let-7d e 26a, 29c respectivamente, os quais apresentaram expressão desregulada em nosso estudo. Foi

detectada também diminuição na expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* e *ciap-2* e dos pró-apoptóticos *bax* e *fas-L*, sendo *bcl-2* alvo dos microRNAs 15a, 16 e 21, *ciap-2* alvo dos microRNAs 21, 26a e 130b o gene pró-apoptótico *bax* alvo do microRNA let-7d e *fas-L* alvo dos microRNAs let-7d e 21.

A inesperada *hipoexpressão* do gene anti-apoptótico *bcl-2*, em leucócitos de pacientes com doenças mieloproliferativas, foi descrita por Castro e colaboradores (2005) associando a diminuição da expressão deste gene e aumento dos genes anti-apoptóticos *bcl-x_L*, *bcl-w*, *a1*, *mcl-1* e *c-flip* em Leucemia Mielóide Crônica (LMC) à progressão da doença, resistência das células leucêmicas a apoptose e refratariedade dos pacientes ao tratamento nas fases mais avançadas da doença. Amarante-Mendes (1999) mostrou que em células leucêmicas a expressão de *bcl-2* não está associada à resistência das células a terapia com quimioterápicos.

A hipótese de que há envolvimento de alterações na maquinaria apoptótica na fisiopatologia da PV pode ser reforçada pela observação da desregulação na expressão dos membros da família dos IAPs. Essas moléculas são reconhecidas como responsáveis pelo controle da apoptose por meio do bloqueio das vias mitocondrial e dos receptores de morte (GRZYBOWSKA; SMOLEWSKI, 2008). Neste estudo foi vista a *hipoexpressão* de *ciap-2* em leucócitos de pacientes de PV o qual é possivelmente regulado pelo miR 130b, como predito por bioinformática, cuja expressão encontra-se aumentada nas amostras estudadas.

A desregulação nos níveis de expressão de *bid* e *bax* apesar de não estarem correlacionados às alterações de seus possíveis microRNAs moduladores pode estar associada ao aumento na sobrevivência de células mielóides como sugere o estudo de supressão de *bid* e *bax* utilizando siRNA realizado por Sai e colaboradores (2011).

Em conjunto nossos resultados apontam para a participação dos microRNAs e genes reguladores estudados na fisiopatologia da PV. Os dados sugerem a participação desses microRNAs na regulação da expressão de genes da via intrínseca e de receptores de morte da

apoptose. A figura 19 destaca os principais pontos de atuação dos apoptomirs estudados na regulação da maquinaria apoptótica.

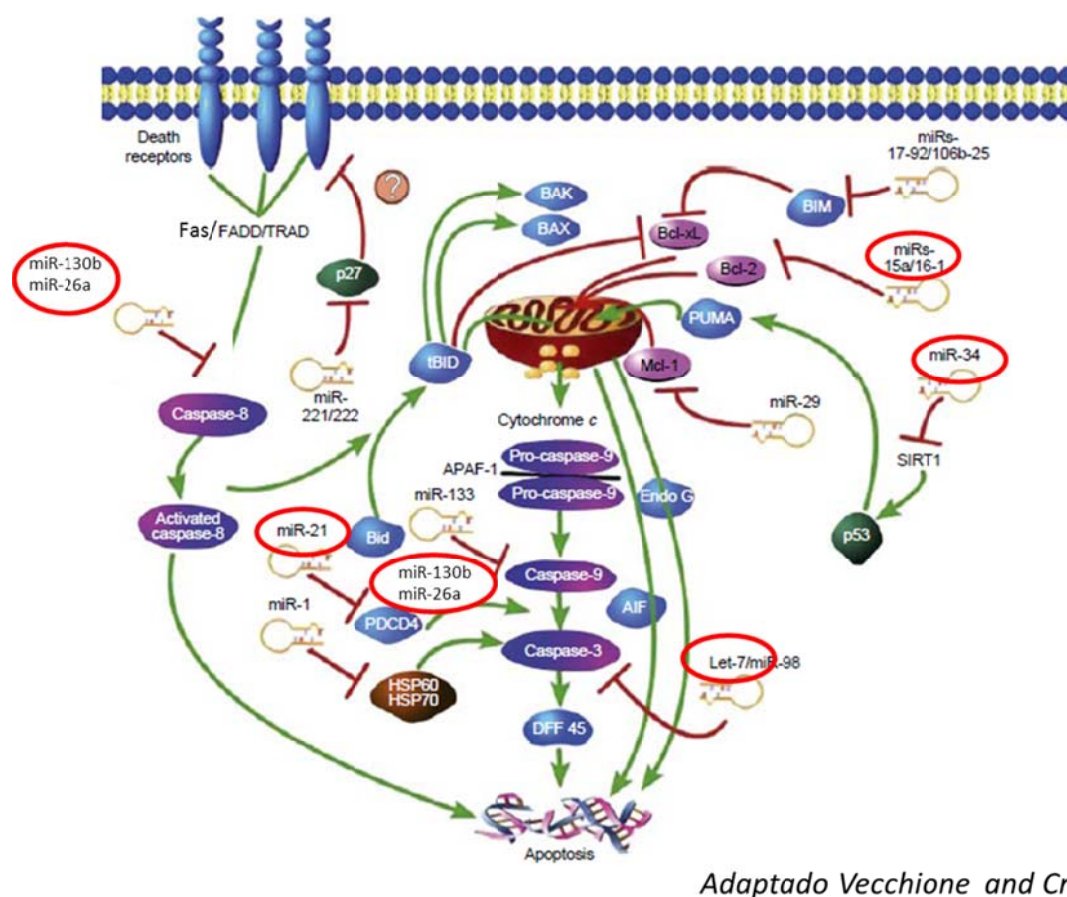


Figura 19: Participação dos apoptomirs na regulação da maquinaria apoptótica. Adaptado de Vecchione and Croce, 2010.

Paralelamente aos estudos relacionados à quantificação dos níveis de expressão de microRNAs e genes envolvidos na apoptose em pacientes, foco principal deste projeto, realizamos Western blotting para confirmação da modulação protéica dos genes analisados. A observação da diminuição da expressão da proteína BCL-2 em pacientes com PV é um dado positivo que reforça a nossa hipótese sobre a regulação da expressão de BCL-2 pelo miR 16, uma vez que estes apresentam expressão aumentada em pacientes de PV, e corrobora com achados descritos por Calin *et al* (2008) acerca da regulação da família bcl-2 pelos miRs 15a e 16-1 em LLC.

Em células CD34⁺, a expressão dos pró-apoptóticos *bid* e *fas*, alvos dos microRNAs 16 e let-7d respectivamente, encontra-se aumentada assim como a expressão dos genes anti-apoptóticos *mcl-1*, *bcl-xl*, *c-flip*.

O aumento na expressão de *mcl-1*, membro da família *bcl-2* e importante gene na regulação da apoptose, associado a alteração na expressão do microRNA 29c corrobora para a hipótese de desregulação da maquinaria apoptótica em pacientes com Policitemia Vera, uma vez que o envolvimento do *mcl-1* na apoptose e sua regulação por esta família de microRNAs foi demonstrado por Mott e colaboradores (2007) que associaram o silenciamento de mir29, em células de carcinoma, ao aumento de expressão de *mcl-1*.

Considerando os dados obtidos da via extrínseca da apoptose, como a *hipoexpressão* de *fas-L* em leucócitos e *hiperexpressão* de *c-flip* em células CD34⁺, especulamos que a desregulação nas expressões desses genes sugerem um perfil de resistência a apoptose mediada pela via extrínseca. Zeuner e colaboradores (2006) descreveram aumento na expressão de *c-flip* em PV e Tognon e colaboradores (2011) descreveram desregulação na expressão de *c-flip* e *fas* em PV. Dessa forma, relacionando os dados de expressão de microRNAs que possuem como alvo moléculas da via extrínseca, podemos inferir que haja ligação do aumento da expressão de let-7d e diminuição da expressão de *fas-L* com a desregulação da apoptose, ou seja, ocorre modulação da via de receptores de morte por microRNAs.

As diferenças encontradas na expressão dos microRNAs em leucócitos de sangue periférico e células CD34⁺ de pacientes podem ser atribuídas ao contexto celular, ou seja células distintas possivelmente apresentam diferentes mecanismos reguladores e moduladores envolvidos nos processos de maturação, proliferação e sobrevivência celular (HUANG; ZON, 2008). Além disso, esses dados estão associados às diferentes condições de purificação aplicadas para o isolamento e obtenção das células analisadas. As células CD34⁺ foram obtidas por meio de métodos rigorosos de purificação e os leucócitos do sangue periférico constituem mistura de diferentes tipos celulares.

As correlações observadas entre os níveis de expressão dos microRNAs e seus respectivos genes alvo, reforça a nossa hipótese da associação destas moléculas na regulação da expressão gênica e de moléculas envolvidas na apoptose e consequente interferência na fisiopatologia das doenças mieloproliferativas. Como exemplo da importância deste dado podemos citar o miR 21, um dos primeiros microRNAs descritos no genoma humano, classificado por Selcuklu e colaboradores como um oncomir por terem associado o aumento dos seus níveis de expressão ao pior prognóstico em diversos tipos de câncer e por terem demonstrado em células de glioblastoma o seu forte potencial anti-apoptótico. Desta maneira, observar a hiperexpressão de miR21 correlacionada a (des) regulação do gene *bcl-2* é um importante dado obtido neste estudo.

Ainda em relação à modulação da expressão gênica, Calin e colaboradores (2008) descreveram a participação dos miR 15a e 16 como supressores de tumor através da regulação da família de oncogenes BCL-2 em LLC, o que corrobora com os resultados encontrados nesse estudo e demonstrado na correlação entre a expressão do gene *bcl-2* e os níveis de aumentados de expressão do miR-16.

Slavov e colaboradores (2010) associaram baixos níveis de expressão de miR-16 ao melhor prognóstico e o aumento de sua expressão ao mau prognóstico em LLA, o que aponta para a possibilidade de utilização dessas moléculas como marcadores para diagnóstico e importantes na determinação da conduta terapêutica.

Realizamos também a determinação da porcentagem de apoptose de linfócitos do sangue periférico de pacientes com PV após a indução com drogas, pois até o presente momento este perfil não é conhecido, visto que os poucos trabalhos descrevendo a participação de microRNAs em Policitemia Vera têm como objeto de estudo a eritropoese com foco na maturação celular (BRUCHOVA *et al*, 2009).

As drogas utilizadas para desencadear a apoptose, a Actinomicina D (ACT-D), Cicloheximida (CHX), Etoposídeo (VP-16), Tenoposídeo (VM-26), Citarabina (ARA-C) e Estaurosporina (STS) possuem diversos mecanismos de ação, dentre eles: inibição da síntese de DNA e protéica, interferência na função da topoisomerase II entre outros (WAJANT *et al*, 2000).

È possível observar através da metodologia empregada para determinar a porcentagem de apoptose em linfócitos dos pacientes, Anexina-V FITC, que os valores de porcentagem de linfócitos em apoptose nos pacientes foram menores do que no grupo Controle, o que corrobora com o descrito em Tognon *et al* (2011). Esse dado indica que os linfócitos dos pacientes apresentaram alta resistência às drogas indutoras de apoptose. Comumente observa-se a resistência às drogas nas células de pacientes com doenças neoplásicas acreditamos que o resultado observado no perfil da porcentagem de apoptose dos pacientes analisados pode estar relacionada às alterações na expressão dos microRNAs e genes envolvidos na apoptose.

Na análise de correlação dos apoptomirs com os parâmetros hematológicos apenas o mir16 apresentou correlação significativa com a porcentagem de alelos Jak2V617 mutados nas amostras analisadas. Entretanto, a análise das correlações dos parâmetros hematológicos, hemoglobina e hematócrito, dos pacientes com a expressão de microRNAs e genes representam importantes evidências que, mesmo ainda não tendo sido descritas na literatura, são relevantes. Os valores de hematócrito e hemoglobina são decisivos para o diagnóstico, avaliação prognóstica e escolha da terapia adotada no tratamento dos pacientes com policitemia vera o que torna o resultado intrigante e motiva novas buscas para a compreensão do verdadeiro papel destas moléculas no desencadeamento da doença.

Neste contexto, acreditamos que a alteração na expressão de apoptomirs em pacientes com PV associa-se à desregulação da maquinaria apoptótica e contribui para o perfil de acúmulo de células observado nos pacientes. Porém, mais estudos são necessários para confirmar a relação desses microRNAs com os genes em questão.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo indicam que os pacientes com Policitemia Vera:

1. Apresentam aumento da expressão dos microRNAs 29c, 16, 21, 26a, 130b e let-7d e diminuição de miR15a e 34c em leucócitos de sangue periférico;
2. Aumento de expressão dos miRs 29c, 16 e 21; diminuição na expressão de miR 130b e let-7d em células CD34⁺ ;
3. Alteração na expressão de genes pró e anti apoptóticos em leucócitos de sangue periférico, com aumento de *a1*, *mcl-1* e diminuição de *bcl-2*, *ciap-2*, *bax* e *fas-L*;
4. Alteração na expressão de genes pró e anti-apoptóticos em células CD34⁺, aumento de expressão de *fas*, *bid*, *mcl-1*, *bcl-xl* e *c-flip*; diminuição na expressão de *bik*;
5. Correlação entre as alterações na expressão dos apoptomirs 29c, 15a, 16, 21, 26a, 130b, let-7d com os respectivos genes alvos *a1*, *mcl-1*, *bcl-2*, *bcl-xl*, *ciap-2*, e *c-flip*, *bax*, *fas-L*, *fas*, *bid*, e *bik*.
6. Correlação entre a alteração na expressão de apoptomirs e genes alvo com os parâmetros hematológicos, Ht, Hb e porcentagem de alelos mutados, em pacientes com Policitemia Vera.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE-MENDES, G. P.; FINUCANE, D. M.; MARTIN, S.J. *et al* ANTI-Apoptotic oncogenes prevent caspase dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ.*, v. 4, p. 298-306, 1998.

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. *J. Med. Biol. Res.*, v.32, p.1053-1061, 1999.

BEEZHOLD, J.K; CASTRANOVA, V.; CHEN, F. *et al* Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. *Mol. Cancer*, v.134, p. 1-9, 2010

BORNER, C. The *Bcl-2* protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.*, v.39, p.615 – 647, 2003.

BRENNER, D.; MAK, W.T. Mitochondrial Cell Death Effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 21, p. 871-877, 2009.

BRUCHOVA, H. *et al*. Erythropoiesis in Polycythemia Vera is Hyper-Proliferative and has Accelerated Maturation. *Blood Cells Mol. Dis.*, v.43, p. 81-87, 2009.

BRUMATTI, G.; WEINLICH R.; CHEHAB, C.F. *et al*. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Lett.*, v.541, p.57-63, 2003.

BUENO-DA-SILVA, A. E.B. Aspectos moleculares da transformação celular induzida por Bcr-Abl. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 2008.

CALIN, G.A.; DUMITRU, C.D.; HYSLOP, T. *et al*. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR 16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 15524-15529, 2002.

CALIN, G.A; CIMINO, A.; FABBRI, M. *et al* mir-15a and miR16-1 cluster functions in human leukemia. *PNAS*, v. 105, p. 5166- 5171, 2008.

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

CASTRO, F.A.; JACYSYN, J.F.; ULBRICH, A.G. et al. Overexpression of the anti-apoptotic genes *mcl-1*, *bcl-w*, *bcl-x_L* and *al* is correlated with to Chronic Myelogenous Leukemia progression and resistance to Gleevec. **Blood**, New York: v. 106, abstract 2880, Nov 2005.

CHENG, A.M.; BYROM, M.W.; SHELTON, J. et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. **Nucleic Acid Res.**, v. 33, p. 1290-1297, 2005.

CIMMINO, A.; CALIN, G.A.; FABBRI, M. et al. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **PNAS**, v.102, p.13944-13949, 2005.

CORREA, P.N.; ESKINAZI, D.; AXELRAD, A.A. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor 1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. **Blood**, v.83, p. 99-112, 1994.

DAI, C.; CHUNG, I.J.; KRATZ, S.B. et al. Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt/PKB. **Exp. Hematol.**, v. 33, p. 152-158, 2005.

DEJEAN, L. M. ; RYU, S. H. ; PEIXOTO, P. M. et al. MAC and Bcl-2 family proteins conspire in a deadly plot. **Bioch. Bioph. Acta**, 2010. *In Press*. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science>.

DELHOMMEAU, F.; PISANI, D.F., JAMES, C. et al. Oncogenic mechanisms in Myeloproliferative disorders. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 2939–2953, 2006.

DELHOMMEAU, F.; DUPONT, S.; TONETTI, C.; et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. **Blood**, v. 109, p. 71–77, 2007.

DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 10, p. 262-267, 1998.

FERNANDEZ-LUNA, J.L.; SILVA, M.; RICHARD, C. et al. Pathogenesis of Polycythemia Vera. **Haematologica**, v. 83, p. 150-158, 1998

FERNANDEZ-LUNA, J. Apoptosis and Polycythemia vera. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 06, p. 94-99, 1999.

FRIEDMAN, J.M.; JONES, P.A. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. **Swiss Med Wkly**, v. 139, p. 466-472, 2009.

GASPAROTTO, E. P. L. Expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticas em células precursoras da medula óssea e leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de policitemia vera. 2009. 185f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H.K.; van DONGEM, S. miRbase: tools for microRNA genomics. *Nucleic. Acid. Res*, v. 36, p. 154-158, 2008.

HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L.C. *et al.* Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.*, v. 236, p. 1-26, 1996.

HUANG, H-T.; ZON, L.I. Regulation of Stem Cells in the Zebra Fish Hematopoietic System. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v.73, p. 111-118, 2008

HUANG, Z. The chemical biology of apoptosis. Exploration protein-protein interactions and life and death of cell with small molecules. *Chem. Biol.*, v. 9, p. 1059-1072, 2002.

IZYDORCZYK-GRZYBOWKA, O. AND SMOLEWSKI. P. The Role of the Inhibitor of apoptosis protein (IAP) family in hematological malignancies. *Postepy Hig Med Dosw*, v.62, p. 55-63, 2008.

JAMES, C.; UGO, V.; COUÉDIC, J.P. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature*, v. 434 (7037), p. 1144 – 1148, 2005.

JIN, Z., EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.*, v. 4, p. 139 – 163, 2005.

KERSCHER, A.; SLACK, F.J. Oncomirs, microRNAs with a role in cancer. *Nature*, v.6, p. 259-269, 2006.

KUMAR, M.S; Lu, J.; MERCER, K.L. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet*, v. 39, p. 673-677, 2007

LEVINE, R.L.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A. *et al.* Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat. Rev. Cancer*, v. 7, p. 673 – 683, 2007.

MATTICK, J.S.; MAKUNIN, I.V. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum. Mol. Genet.*, v.14, p.121-132, 2005.

MIRZA, A.M; EZZAT, S.; AXELRAD, A.A. Insulin-like growth factor binding protein-1 is elevated in patients with Polycythemia vera and stimulates erythroid burst formation in vitro. *Blood*, v.89, p. 1862-1869, 1997.

METZLER, M.; WILDA, M. BUSCH, K. *et al.* High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt Lymphoma. *Genes Chromosome Cancer*, v. 39, p. 167-169, 2004.

MOTT, J.L.; KOBAYASHI, S.; BRONK, S.F. *et al.* miR-29 regulates MCL-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, v. 26, p. 6133-6140, 2007.

ODA, A.; HASEYAMA, Y.; SAWADA, K. *et al.* Phosphatidylinositol-3 kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood*, v. 94, p. 1560-1577, 1999.

OVCHARENKO D.; LEJNAR K.; JOHNSON C. *et al.* Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res.*, v. 67, p. 10782-10788, 2007.

SAI, T.; MATSUDA, F. *et al.* Effect of RNA interference of Bid and Bax mRNAs on Apoptosis in granulosa cell- derived KNG cells. *J. Reprod. Dev* (Epub ahead of print), 2011

SELCUKLU, D. S.; DONOGHUE, A.T.M. *et al.* miR-21 as a Key Regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society Transactions*, v.37, p. 918-925, 2009.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell*, v. 9, p.459-70, 2002.

SLAVOV, S.N., GIMENES, T.H.K.; REGO, E.M. The role of micro-ribonucleic acids in normal hematopoiesis and leukemic T-lymphogenesis. *Braz J Med*, v. 43, p. 619-626, 2010.

SPIVAK, J.L. Polycythemia vera: myths, mechanisms and management. *Blood*, v. 100, p.4272-90, 2002.

SPIVAK, J.L. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin. Hematol.*, v. 41, p. 1-5, 2004.

SPIZZO R., CALIN G.A. Multiple approach to analyzing the role of microRNAs in apoptosis. *Methods Mol. Biol.*, v. 559, p. 219-245, 2009.

SUBRAMANIAN S.; STEER C.J. MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, v. 223, p. 289-298, 2010

TEFFERI, A. Annual clinical updates in hematological malignances: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocytemia: 2011 updates on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J. Hematol*, v. 86, p. 292-301, 2011.

THOMADAKI, H.; SCORILAS. A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sciences*, v. 43, p. 1-67, 2006.

TOGNON, R.; GASPAROTTO, E. P.; LEROY, J.M. *et al.* Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in cronic myeloproliferative diseases. *J. Clin Pathol.*, v. 64, p. 75-82, 2010.

VAINCHENKER, W.; DELHOMMEAU, F.;CONSTANTINESCU, S.N. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, v. 118, p. 1723-1735, 2011

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

VARDIMAN, J.W.; THIELE, J.; ARBER, D.A. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, v. 114, p. 937 –951, 2009.

VECCHIONE, A.; CROCE, M.C. Apoptomirs. *Endocrine-Related Cancer*, v.17, p. 37-50, 2010.

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

WAJANT, H.; HAAS, E.; SCHWENZER, R. *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, 2000.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, Cold Spring Harbor: v. 15, p. 2922 – 2933, 2001.

YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 21, p. 35 – 56, 2005.

ZANETTE, D.L.; RIVADAVIA, F.; MOLFETTA, G.A. et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, p. 1435-1440, 2007.

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

ZHANG, L.; ZHAO, H.; SUN, A. 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

ZHANG, L.; HUANG, J.; YANG, N. et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *PNAS*, v.103, p. 9136-41, 2006.

ZHAO, Y.; SRIVASTAVA, D. A development view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.*, v.32, p. 189-197, 2007.

8. ANEXO

ANEXO 1- ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA



Ribeirão Preto, 21 de julho de 2010

Ofício nº 2306/2010
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado “**EXPRESSÃO DE microRNAs EM POLICITEMIA VERA**” foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4908/2010.

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.


DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

NATÁLIA DE SOUZA NUNES

FABÍOLA ATTIÉ DE CASTRO (Orientadora)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

9. APÊNDICE

APÊNDICE 1- Resumo dos resultados dos Níveis de Expressão dos apoptomiRs e genes envolvidos na apoptose nos pacientes em relação aos controles.

Tabela 1: Resultados dos Níveis de Expressão dos ApoptomiRs em Pacientes com PV.

MiR	SPP	MOP
29c	Hiperexpresso	Hiperexpresso
15^a	Hipoexpresso	Não significativo
16	Hiperexpresso	Hiperexpresso
21	Hiperexpresso	Hiperexpresso
26^a	Hiperexpresso	Não significativo
130b	Hiperexpresso	Hipoexpresso
Let-7d	Hiperexpresso	Hipoexpresso
34c	Hipoexpresso	Não analisado
451	Não significativo	Não analisado

PV: Policitemia Vera.

Tabela 2: Níveis de Expressão dos Genes Envolvidos na Apoptose em Pacientes com policitemia vera em relação aos controles.

GENE	SPP	MOP
<i>bax</i>	<i>Hipoexpresso</i>	Não significativo
<i>faz</i>	Não significativo	<i>Hiperexpresso</i>
<i>fasl</i>	<i>Hipoexpresso</i>	Não analisado
<i>bid</i>	Não significativo	<i>Hiperexpresso</i>
<i>bik</i>	Não significativo	<i>Hipoexpresso</i>
<i>a1</i>	<i>Hiperexpresso</i>	Não significativo
<i>mcl-1</i>	<i>Hiperexpresso</i>	<i>Hiperexpresso</i>
<i>bcl-2</i>	<i>Hipoexpresso</i>	Não significativo
<i>bcl-x₁</i>	Não significativo	<i>Hiperexpresso</i>
<i>ciap-2</i>	<i>Hipoexpresso</i>	Não significativo
<i>C-flip</i>	Não significativo	<i>Hiperexpresso</i>

SPP: sangue periférico do paciente; MOP: medula óssea do paciente.

APÊNDICE 2- Resumo das Correlações entre expressão dos Apoptomirs e Genes Alvo.

Tabela3: Correlação entre os níveis de expressão dos Apoptomirs e Genes alvo

Níveis de Expressão Apoptomir x Gene Alvo		SPP	MOP
15a	vs <i>Bcl-2</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
	vs <i>Bik</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
Let-7d	vs <i>Bax</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
	vs <i>A1</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
	vs <i>Fas</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
	vs <i>Fas-l</i>	p=0,009; r=0,438	Não analisado
26a	vs <i>C-flip</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
	vs <i>Ciap-2</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
	vs <i>Mcl-1</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
16	vs <i>Bid</i>	p \square 0,05	p=0,045; r=0,387
	vs <i>Bik</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
	vs <i>Bcl-2</i>	p=0,033; r=0,358	p=0,0469; r=0,384
	vs <i>Bcl-xl</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
21	vs <i>Bcl-2</i>	p \square 0,05	P=0,033; R=-0,417
	vs <i>Fas-l</i>	p \square 0,05	Não analisado
	vs <i>Ciap-2</i>	p \square 0,05	p \square 0,05
29c	vs <i>Mcl-1</i>	p=0,040; r=0,334	p \square 0,05
130b	vs <i>Ciap-2</i>	p=0,004; r=-0,488	p=0,037; r=-0,490
451		Não analisado	Não analisado
34c		Não analisado	Não analisado