

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**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.**

Elainy Patrícia Lino Gasparotto

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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.

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

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Elaine Patrícia Lino Gasparotto

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Attié de Castro

Ribeirão Preto
2009

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.

Gasparotto, Elaine Patrícia Lino

Expressão de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticas em células precursoras da medula óssea e leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de policitemia vera. 2009.

185 p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Souza, Ana Maria de

Co-orientadora: Castro, Fabíola Attié de

1. Policitemia vera. 2. apoptose. 3. genes anti- e pró-apoptóticos. 4. proteínas anti- e pró-apoptóticas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Elainy Patrícia Lino Gasparotto

Expressão de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticas em células precursoras da medula óssea e leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de policitemia vera.

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

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria de Souza

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À memória do meu pai Luiz pelo exemplo de força, dedicação, liderança e coragem, e à minha família, minha mãe Maria, meus irmãos Evelainy, Leandro e Eveline, pelo apoio, carinho e por não me deixarem desistir nunca. e à Minha filha Maria Luiza, pelo amor incondicional, por iluminar meus dias e pela difícil superação da distância.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço à minha mãe Maria por tudo que me ensinou, incentivou, e por ter me proporcionado condições de chegar até aqui, principalmente cuidando da minha filha com tanto amor e dedicação;

Ao meu irmão Leandro, por ter mostrado muitas vezes que o caminho certo nem sempre era o mais fácil;

À minha irmã Evelainy, meu cunhado Giuliano e meus sobrinhos Luiz Gustavo e Giulia, por sempre se fazerem presentes apesar da distância, por toda a amizade e alegria;

À minha irmã Eveline e Cunhado Henrique, por todo o carinho e consideração;

À minha tia Maria Aparecida por todas as conversas amigas e por deixar sua vida e trazer minha filha para perto de mim;

À minha filha Maria Luiza, que mesmo tão pequenina me ensinou que o amor supera todas as barreiras e acreditar sempre é a melhor saída para a superação das dificuldades;

Aos pacientes e aos indivíduos controles que participaram deste projeto, pois sem estes esta pesquisa não seria possível;

Às minhas orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Souza e co-orientadora Prof^a. Dr^a Fabíola Attié de Castro pela disponibilidade, atenção, paciência e por todos os ensinamentos;

À Dr^a. Simone Kashima pela colaboração e por todo auxílio prestado e ensinamentos em Biologia Molecular ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

À Dr^a. Rita Cássia V. Carrara pela colaboração, e por nos fornecer amostras de células precursoras CD34⁺ isoladas de medula óssea utilizadas nos ensaios em Biologia Molecular deste trabalho;

À Dr^a. Kelen C. R. M. de Farias pelos ensinamentos na técnica de isolamento de células CD34⁺.

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas pela colaboração e permissão para que os experimentos de biologia molecular fossem realizados no Centro Regional de Hemoterapia;

À Patrícia V. B. Palma e Camila Cristina B. O. Menezes do laboratório de Citometria de Fluxo do Centro Regional de Hemoterapia pela análise da pureza das células CD34⁺ nas amostras dos pacientes.

A Prof^a. Dr^a. Belinda P. Simões, Dr. Carlos E. E. Velano e demais médicos do ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela colaboração na seleção, intervenção e coleta de amostras dos pacientes. E a funcionária Maria Helena Silva Scaffo do Laboratório de Hematologia HCFMRP – USP, por auxiliar na separação de amostras dos pacientes.

As Dr^a Maria Aparecida Zanichelli e Elizabeth E. X. Souto do Hospital Brigadeiro em São Paulo pela colaboração na seleção, intervenção e coleta de amostras dos pacientes.

Às amigas e colaboradoras Raquel Tognon, Gislane L. V. de Oliveira e Aline F. Ferreira pela amizade, companheirismo, ajuda, informações, paciência e apoio;

Às amigas Ieda Maria M. Paino, Julise Cunha Miranda, Flávia Aparecida Paina, Cristiane Fernandes Freitas por todos os ensinamentos, amizade, força e apoio incondicionais em todos os momentos durante o doutorado.

À Marcella Daruge Grando, Zita Maria de Oliveira Gregório e Solange Bocardo por todo auxílio e presteza nos experimentos realizados no Laboratório de Hematologia da FCFRP;

Às funcionárias Evandra Strazza Rodrigues e Rochele Azevedo por toda ajuda e apoio durante a minha permanência no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro;

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular pela ajuda, paciência e apoio: Julio Edward Hough Monteiro, Larissa Deadame de Figueiredo Nicolete, Rodrigo Haddad e Tathiane Maistro Malta.

À Fabiana Rossetto de Moraes, responsável pela Citometria de Fluxo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas em Ribeirão Preto – USP, pelas análises de células em apoptose das amostras dos pacientes.

Aos Professores Dr. Marcelo Baruffi e Dr^a. Maria Regina Torqueti por disponibilizar de diversos equipamentos de seus laboratórios. E também à Marlise Bonetti do mesmo laboratório pelos ensinamentos e apoio;

Aos Professores do Laboratório de Bioquímica Dr. Sérgio Akira Uyemura e Dr^a. Andréia Machado Leopoldino pela disponibilização da sala de revelação e pela ajuda. E à Flávia Amoroso Matos do mesmo laboratório pelas dicas e apoio;

À Amélia Regina Albuquerque pela atenção e auxílio com as figuras do *Western blotting*;

Aos amigos Adriana A. Miranda, Cinthia F. G. Dias, e Marcelo A. Caires por toda amizade, força e apoio fundamentais em todos os momentos.

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	xviii
Lista de abreviaturas e siglas	xix
I. INTRODUÇÃO.....	01
I.1. Patogênese da Policitemia vera.....	05
I.2. Apoptose e Policitemia vera.....	12
II. OBJETIVOS.....	22
II.1. Geral.....	23
II.2. Específicos.....	23
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
III.1. Pacientes e Controles.....	25
III.2. Métodos.....	29
III.2.1. Obtenção dos leucócitos, linfócitos e células CD34 ⁺ hematopoéticas.....	29
III.2.2. Extração de RNA a partir do trizol, síntese de cDNA e PCR em tempo real quantitativo.....	31
III.2.3. Extração de proteínas.....	42
III.2.4. Detecção das proteínas anti- e pró-apoptóticas por Western blot.....	43
III.2.5. Indução e detecção de apoptose dos linfócitos por citometria de fluxo.....	44
III.2.6. – Detecção da mutação V617F do gene da Janus Kinase 2.....	46
III.2.7. Análise estatística.....	47
IV. RESULTADOS.....	49
IV.1. Dados clínico-laboratoriais, e separação das células CD34 ⁺ e linfócitos.....	50
IV.2. Perfil de expressão dos genes anti- e pró-apoptóticos.....	54
IV.3. Correlação da expressão gênica e dados clínicos e laboratoriais dos pacientes	80

IV.3.1 Correlação da expressão gênica e a mutação JAK2 V617F.....	80
IV.3.2 Correlação da expressão gênica e a concentração de hemoglobina.....	82
IV.3.3 Correlação da expressão gênica e hematócrito.....	84
IV.3.4 Correlação da expressão gênica com a contagem de plaquetas circulantes.....	86
IV.3.5 Correlação da expressão gênica com o aumento do tamanho do baço.....	88
IV.4. Perfil de resistência dos linfócitos dos pacientes à morte celular.....	91
IV.4.1 Ensaio de indução de apoptose de linfócitos.....	91
IV.4.1.1 Marcação com Anexina V – FITC.....	91
IV.4.1.2 Marcação com Hypotonic-Fluorescent-Solution (HFS).....	97
IV.5. Correlação do perfil de resistência à morte celular e a percentagem de alelos mutados JAK2 V617F e expressão gênica.....	102
IV.5.1 Correlação da resistência à morte celular e percentagem de alelos mutados....	102
IV.5.2 Correlação da resistência à morte celular e expressão gênica.....	105
IV.6. Expressão protéica de genes relacionados a maquinaria apoptótica.....	130
V. DISCUSSÃO.....	138
VI. CONCLUSÃO.....	156
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159
APÊNDICE.....	175
ANEXOS.....	177

RESUMO

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

A policitemia vera (PV) é uma doença mieloproliferativa clonal que afeta o progenitor hematopoético multipotente causando o acúmulo de eritrócitos, leucócitos e plaquetas morfológicamente normais e seus precursores, na ausência de um estímulo definido. Alterações na regulação da apoptose parece ser uma das causas do acúmulo de células eritróides sem a necessidade de eritropoetina. A mutação JAK2 V617F foi descrita como um dos eventos envolvidos na fisiopatologia das Doenças Mieloproliferativas Crônicas, sendo relacionada a um pior prognóstico. Esta mutação resulta na ativação constitutiva da enzima Janus Kinase 2 e conseqüentemente das vias de sinalização associadas ao estímulo celular mediado por citocinas e fatores de crescimento. O objetivo deste estudo foi investigar as alterações da expressão de proteínas e genes envolvidos na regulação da apoptose em pacientes com PV sem tratamento. Para tanto foi quantificada a expressão de genes e proteínas da família Bcl-2 e da via extrínseca da apoptose em células precursoras e leucócitos desses pacientes e de indivíduos saudáveis. Os leucócitos do sangue periférico de 12 pacientes e 14 controles foram obtidos pelo método de Haes-esteril. As células precursoras CD34⁺ destes pacientes e de 19 controles foram separadas em coluna imunomagnética. A detecção da expressão gênica e protéica das moléculas anti- e pró-apoptóticas foi realizada pelas técnicas de PCR em tempo real e *Western-blot*, respectivamente. Foi avaliada ainda a resistência à morte celular induzida por agentes apoptogênicos dos linfócitos dos pacientes. As células CD34⁺ e maduras mostraram expressão aumentada dos genes *a1*, *mcl-1*, *nox*, *c-flip* e *ciap-2*. A expressão dos genes *bid*, *bim-EL*, *fas* e *faim* estava elevada e a dos genes *bcl-2*, *bcl-xL* e *bax* diminuída, somente nas células CD34⁺. Nos leucócitos, observou-se ainda maior nível de expressão do gene *bok* e expressão diminuída dos genes *bcl-2*, *bcl-xL*, *bad*, *bax*, *faim*, *dr4*, *dr5* e *trail*. Os genes *bcl-w*, *bak*, *bik*, *fasL* e *ciap-1* não mostraram diferença significativa na expressão em células CD34⁺ e leucócitos de pacientes e controles (p>0,05). Houve significância estatística nas correlações entre: expressão de *dr5* e mutação JAK2 V617F; *bim-EL* com concentração de hemoglobina e com hematócrito; *bcl-w* e número de plaquetas; *a1*, *bad*, *bax* nas células CD34⁺ e *bad* em leucócitos com aumento do baço. Os linfócitos dos pacientes foram mais resistentes a apoptose mediada por ACT D 1uM e 5uM, ARA-C 25uM, CHX 25uM, VP-16 e VM-26 25uM. Houve correlação entre a percentagem de alelos mutados para JAK2 V617F e o perfil de resistência aos indutores de apoptose dos linfócitos dos pacientes a ACT D 1 uM e 5uM e STS 5uM. Observou-se ainda correlação estatística entre: expressão de *a1* com ACT D 5 uM, CHX 50uM e ARA-C 25uM; *bad* com CHX 25uM e teniposídeo 25uM; *bcl-2* com ACT D 5uM, CHX 50uM, STS 1uM e 5uM e VP-16 a25uM; *bid* com ACT D 5uM e VM-26 25uM; *bik* com ACT D 5uM, STS 1uM e 5uM e VM-26 25uM, ARA-C 25uM e VP-16 25uM; *bim-EL* com CHX 25uM e teniposídeo 25uM; *bok* com ACT D 5uM STS 1uM e 5uM, ARA-C 25uM e etoposídeo 25uM; *ciap-1* com ACT D 1uM e 5uM, STS 1uM e VP-16 25uM; *dr4* com ACT D 5uM, ARA-C 25uM, VP-16 a 25uM; *dr5* com ACT D 5uM, STS 1uM, ARA-C 25uM e VP-16 25uM; *faim* com ACT D 5uM; *mcl-1* com ARA-C 25uM e STS 1uM; *trail* com ACT D 5uM. As proteínas A1, BAD e c-FLIP tiveram o mesmo perfil de expressão dos seus respectivos genes, contudo os níveis de expressão protéica para BCL-xL estavam aumentados e para BIM-EL diminuídos, resultados discordantes com os obtidos nas expressões gênicas. Em conjunto esses resultados sugerem que a *maquinaria apoptótica* está desregulada, o que poderia contribuir, pelo menos

em parte, com a *mieloacumulação* observada no SP e MO dos pacientes com PV.

Palavras-chaves: Policitemia vera, apoptose, genes pró- e anti- apoptóticos, proteínas pró- e anti- apoptóticas.

ABSTRACT

GASPAROTTO, E.P.L. **Pro- and anti-apoptotic genes and proteins expression in bone marrow precursors and peripheral blood leukocytes in polycythemia vera patients. 185f.** Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Polycythemia vera (PV) is a clonal myeloproliferative disease arising in a multipotent haematopoietic progenitor cell causing the accumulation of erythrocytes, leukocytes and platelets morphologically normal and their precursors in absence of a definable stimulus. Apoptosis deregulation seems to be one of the causes of erythroid cells accumulation without the need for erythropoietin. The JAK2 V617F mutation has been described as one of the events involved in pathophysiology of chronics myeloproliferative diseases, being related to worse prognosis. This mutation results in constitutive activation of the enzyme Janus kinase 2 and consequently of signaling pathways associated with cell stimulation mediated by cytokines and growth factors. This study aimed to investigate changes in expression of proteins and genes involved in regulation of apoptosis in PV patients without treatment. Was quantified for both gene and proteins expression of the Bcl-2 family and the extrinsic pathway of apoptosis members in precursor cells and leukocytes of patients and healthy subjects. Peripheral blood leukocytes of 12 patients and 14 controls were obtained by the Haes-sterile method. CD34⁺ precursor cells of these patients and 19 controls were separated by immunomagnetic column. Anti- and pro-apoptotic gene and protein expression detection was performed by real-time PCR and Western-blot techniques respectively. It also assessed the resistance to cellular death induced by apoptogenics agents in PV lymphocytes. CD34⁺ and mature cells showed increased expression of *a1*, *mcl-1*, *nox*, *c-flip* and *ciap-2*. Gene expression of *bid*, *bim-EL*, *fas* e *faim* was high and to genes *bcl-2*, *bcl-xL* and *bax* diminished, only in CD34⁺ cells. In leukocytes, there was even greater level of expression of *bok* and reduced of *bcl-2*, *bcl-xL*, *bad*, *bax*, *faim*, *dr4*, *dr5* and *trail*. Not significant difference was found to *bcl-w*, *bak*, *bik*, *fasL* and *ciap-1* expression in CD34⁺ cells and leukocytes of patients and controls (p> 0.05). There was statistical correlation between: *dr5* expression and JAK2 V617F mutation; *bim-EL* with hemoglobin concentration and hematócrito; *bcl-w* and platelets counts; *a1*, *bad*, *bax* in CD34⁺ cells and *bad* in leukocytes with enlarged spleen. PV lymphocytes were more resistant to apoptosis mediated by ACT D 1uM and 5uM, ARA-C 25uM, CHX 25uM, VP-16 25uM and VM-26 25uM. There was correlation between JAK2 V617F allele burden and resistance profile to apoptosis inducers in PV lymphocytes to ACT D 1uM and 5uM and STS 5uM. There was also correlation between: *a1* expression with ACT D 5 uM, CHX 50uM and ARA-C 25uM; *bad* with CHX 25uM and teniposide 25uM; *bcl-2* with ACT D 5uM, CHX 50uM, STS 1uM and 5uM and VP -16 25uM; *bid* with ACT D 5uM and VM-26 25uM; *bik* with ACT D 5uM, STS 1uM and 5uM, VM-26 25uM, ARA-C 25uM and VP-16 25uM; *bim-EL* with CHX 25uM and teniposide 25uM ; *bok* with ACT D 5uM, STS 1uM and 5uM, ARA-C 25uM and etoposide 25uM; *ciap-1* with ACT D 1uM and 5uM, STS 1uM and VP-16 25uM; *dr4* with ACT D 5uM, ARA-C 25uM, VP-16 25uM; *dr5* with ACT D 5uM, STS 1uM, ARA-C 25uM and VP-16 25uM; *faim* with ACT D 5uM, *mcl-1* with ARA-C 25uM and STS 1uM; *trail* with ACT D 5uM. The A1, BAD and c-FLIP proteins have the same profile of expression of their genes, however the levels of protein expression in BCL-xL were increased and decreased for BIM-EL, discordant results in related with the one obtained by gene expressions. Taken together these results suggest that apoptotic machinery is deregulated, which could contribute, at least in part, with myeloaccumulation observed in the SP and BM of PV patients.

keywords: polycythemia vera, apoptosis, anti- e pro-apoptotics genes, anti- e pro-apoptotics proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Via de sinalização de JAK-2 V617F em Doenças Mieloproliferativas.....	10
Figura 02: Via extrínseca da apoptose celular.....	15
Figura 03: Via Intrínseca de sinalização mitocondrial.....	17
Figura 04: Esquema de ativação da apoptose.....	18
Figura 05: Exemplo de amostras de RNA aplicadas em gel de agarose 1%.....	32
Figura 06: Exemplo de amostras de cDNA aplicadas em gel de agarose 1%.....	33
Figura 07: Exemplo de curva padrão de cDNA	34
Figura 08: Exemplo de curva de amplificação de cDNA.....	35
Figura 09: Exemplo de curva de dissociação de cDNA.....	36
Figura 10: Fluxograma das metodologias utilizadas.....	48
Figura 11: Expressão do gene <i>a1</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	55
Figura 12: Expressão do gene <i>a1</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	55
Figura 13: Expressão do gene <i>bcl-2</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	56
Figura 14: Expressão do gene <i>bcl-2</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	56
Figura 15: Expressão do gene <i>bcl-w</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	57
Figura 16: Expressão do gene <i>bcl-w</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	57
Figura 17: Expressão do gene <i>bcl-x_L</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	58

Figura 18: Expressão do gene <i>bcl-x_L</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	58
Figura 19: Expressão do gene <i>mcl-1</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	59
Figura 20: Expressão do gene <i>mcl-1</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	59
Figura 21: Expressão do gene <i>bad</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	60
Figura 22: Expressão do gene <i>bad</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	60
Figura 23: Expressão do gene <i>bak</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	61
Figura 24: Expressão do gene <i>bak</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	61
Figura 25: Expressão do gene <i>bax</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	62
Figura 26: Expressão do gene <i>bax</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	62
Figura 27: Expressão do gene <i>bid</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	63
Figura 28: Expressão do gene <i>bid</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	63
Figura 29: Expressão do gene <i>bik</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	64

Figura 30: Expressão do gene <i>bik</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	64
Figura 31: Expressão do gene <i>bim-EL</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	65
Figura 32: Expressão do gene <i>bim-EL</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	65
Figura 33: Expressão do gene <i>bok</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	66
Figura 34: Expressão do gene <i>bok</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	66
Figura 35: Expressão do gene <i>nox</i> a nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	67
Figura 36: Expressão do gene <i>nox</i> a nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	67
Figura 37: Expressão do gene <i>fas</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	68
Figura 38: Expressão do gene <i>fas</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	69
Figura 39: Expressão do gene <i>fasL</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	69
Figura 40: Expressão do gene <i>fasL</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	70
Figura 41: Expressão do gene <i>faim</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	70

Figura 42: Expressão do gene <i>faim</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	71
Figura 43: Expressão do gene <i>dr4</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	71
Figura 44: Expressão do gene <i>dr4</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	72
Figura 45: Expressão do gene <i>dr5</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	72
Figura 46: Expressão do gene <i>dr5</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	73
Figura 47: Expressão do gene <i>trail</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	73
Figura 48: Expressão do gene <i>trail</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	74
Figura 49: Expressão do gene <i>c-flip</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	74
Figura 50: Expressão do gene <i>c-flip</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	75
Figura 51: Expressão do gene <i>ciap-1</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	75
Figura 52: Expressão do gene <i>ciap-1</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	76
Figura 53: Expressão do gene <i>ciap-2</i> nas células CD34 ⁺ da medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico de controle e pacientes com PV.....	76

Figura 54: Expressão do gene <i>ciap-2</i> nos indivíduos saudáveis e pacientes com PV nas diferentes células avaliadas.....	77
Figura 55: Esquema representa o perfil de expressão dos genes apoptóticos em células precursoras de pacientes com PV.....	78
Figura 56: Esquema representa o perfil de expressão dos genes apoptóticos em leucócitos totais de pacientes com PV.....	79
Figura 57: Correlação entre a expressão do gene <i>dr5</i> e a percentagem de alelos mutados para JAK2 V617F.....	80
Figura 58: Correlação entre a expressão do gene <i>bim-EL</i> e a concentração de hemoglobina.....	82
Figura 59: Correlação entre a expressão do gene <i>bim-EL</i> e o hematócrito.....	84
Figura 60: Correlação entre a expressão do gene <i>bcl-w</i> e o número de plaquetas circulantes.....	86
Figura 61: Correlação de expressão do gene <i>al</i> e o aumento do tamanho do baço.....	88
Figura 62: Correlação de expressão do gene <i>bad</i> e o aumento do tamanho do baço.....	89
Figura 63: Correlação de expressão do gene <i>bax</i> e o aumento do tamanho do baço.....	89
Figura 64: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V-FITC após estímulo com actinomicina 1uM.....	92
Figura 65: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V-FITC após estímulo com actinomicina 5uM.....	92
Figura 66: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V/FITC após estímulo com citarabina 25uM.....	93
Figura 67: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V/FITC após estímulo com cicloheximida 25uM...	94

Figura 68: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V/FITC após estímulo com cicloheximida 50uM...	94
Figura 69: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V/FITC após estímulo com estaurosporina 1uM...	95
Figura 70: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V/FITC após estímulo com estaurosporina 5uM...	95
Figura 71: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V/FITC após estímulo com teniposídeo 25uM.....	96
Figura 72: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com Anexina V/FITC após estímulo com etoposídeo 25uM.....	96
Figura 73: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com teniposídeo 25uM.....	97
Figura 74: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com actinomicina 1uM.....	98
Figura 75: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com actinomicina 5uM.....	98
Figura 76: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com citarabina 25uM.....	99
Figura 77: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com cicloheximida 25uM.....	99
Figura 78: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com cicloheximida 50uM.....	100
Figura 79: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com estaurosporina 1uM.....	100

Figura 80: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com estaurosporina 5uM.....	101
Figura 81: Percentagem de apoptose de linfócitos dos controles e pacientes com PV marcados com HFS após estímulo com etoposídeo 25uM.....	101
Figura 82: Correlação da percentagem de apoptose de linfócitos dos pacientes com PV após estímulo com actinomicina 1uM e a percentagem de alelos mutados para JAK2 V617F.....	102
Figura 83: Correlação da percentagem de apoptose de linfócitos dos pacientes com PV após estímulo com actinomicina 1uM e a percentagem de alelos mutados para JAK2 V617F.....	103
Figura 84: Correlação da percentagem de apoptose de linfócitos dos pacientes com PV após estímulo com estaurosporina 5uM e a percentagem de alelos mutados para JAK2 V617F.....	103
Figura 85: Correlação da expressão de <i>a1</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM.....	105
Figura 86: Correlação da expressão de <i>a1</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com cicloheximida 50uM.....	106
Figura 87: Correlação da expressão de <i>a1</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com citarabina 25uM.....	106
Figura 88: Correlação da expressão de <i>bad</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com cicloheximida 25uM.....	107

Figura 89: Correlação da expressão de <i>bad</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com teniposídeo 25uM	107
Figura 90: Correlação da expressão de <i>bcl-2</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM.....	108
Figura 91: Correlação da expressão de <i>bcl-2</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com cicloheximida 50uM.....	109
Figura 92: Correlação da expressão de <i>bcl-2</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estaurosporina 1uM.....	109
Figura 93: Correlação da expressão de <i>bcl-2</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estaurosporina 5uM.....	110
Figura 94: Correlação da expressão de <i>bcl-2</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com etoposídeo 25uM.....	110
Figura 95: Correlação da expressão de <i>bid</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM.....	111
Figura 96: Correlação da expressão de <i>bid</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com teniposídeo 25uM.....	112

Figura 97: Correlação da expressão de <i>bik</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM.....	113
Figura 98: Correlação da expressão de <i>bik</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estaurosporina 1uM.....	113
Figura 99: Correlação da expressão de <i>bik</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estaurosporina 5uM.....	114
Figura 100: Correlação da expressão de <i>bik</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com teniposídeo 25uM.....	114
Figura 101: Correlação da expressão de <i>bik</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com citarabina 25uM.....	115
Figura 102: Correlação da expressão de <i>bik</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com etoposídeo 25uM.....	115
Figura 103: Correlação da expressão de <i>bim-EL</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com cicloheximida 25uM.....	116
Figura 104: Correlação da expressão de <i>bim-EL</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com teniposídeo 25uM.....	116

Figura 105: Correlação da expressão de <i>bok</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM.....	117
Figura 106: Correlação da expressão de <i>bok</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estaurosporina 1uM.....	118
Figura 107: Correlação da expressão de <i>bok</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estaurosporina 5uM.....	118
Figura 108: Correlação da expressão de <i>bok</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com citarabina 25uM.....	119
Figura 109: Correlação da expressão de <i>bok</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com etoposídeo 25uM.....	119
Figura 110: Correlação da expressão de <i>ciap-1</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 1uM.....	120
Figura 111: Correlação da expressão de <i>ciap-1</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM.....	120
Figura 112: Correlação da expressão de <i>ciap-1</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estaurosporina 1uM.....	121

- Figura 113: Correlação da expressão de *ciap-1* em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com etoposídeo 25uM. 121
- Figura 114: Correlação da expressão de *ciap-2* em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM..... 122
- Figura 115: Correlação da expressão de *dr4* em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM..... 123
- Figura 116: Correlação da expressão de *dr4* em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com citarabina 25uM..... 123
- Figura 117: Correlação da expressão de *dr4* em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com etoposídeo 25uM. 124
- Figura 118: Correlação da expressão de *dr5* em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM..... 125
- Figura 119: Correlação da expressão de *dr5* em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estauroporina 1uM..... 125
- Figura 120: Correlação da expressão de *dr5* em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com citarabina 25uM..... 126

Figura 121: Correlação da expressão de <i>dr5</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com etoposídeo 25uM.....	126
Figura 122: Correlação da expressão de <i>faim</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com actinomicina 5uM.....	127
Figura 123: Correlação da expressão de <i>mcl-1</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com citarabina 25uM.....	128
Figura 124: Correlação da expressão de <i>mcl-1</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com estaurosporina 1uM.....	128
Figura 125: Correlação da expressão de <i>trail</i> em leucócitos do sangue periférico dos pacientes com PV com a percentagem de apoptose de linfócitos, após estímulo com citarabina 25uM.....	129
Figura 126: Figuras do Western blotting para proteína A1.....	131
Figura 127: Figuras do Western blotting para proteína BAD.....	132
Figura 128: Figuras do Western blotting para proteína BCL-x _L	133
Figura 129: Razão do IDV da proteína BIM- _{EL} pela ACTINA.....	134
Figura 130: Figuras do Western blotting para proteína BIM- _{EL}	135
Figura 131: Razão do IDV da proteína c-FLIP pela ACTINA.....	136
Figura 132: Figuras do Western blotting para proteína c-FLIP.....	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Caracterização demográfica dos pacientes com PV procedentes do HB-SP e do HCFMRP-USP.....	26
Tabela 02: Caracterização demográfica dos doadores de medula óssea procedentes do HCFMRP-USP	27
Tabela 03: Caracterização demográfica dos doadores de sangue periférico procedentes do FCFRP-USP	28
Tabela 04: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos cDNA...	37
Tabela 05: Padronizações das reações de amplificação dos genes estudados.....	39
Tabela 06: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com policitemia vera.....	51
Tabela 07: Pesquisa da mutação do gene da Janus Kinase 2.....	52
Tabela 08: Células CD34 ⁺ obtidas das amostras de medula óssea.....	53
Tabela 09: Correlações da expressão gênica e a percentagem de JAK2 V617F ⁺	81
Tabela 10: Correlações da expressão gênica e a concentração de hemoglobina.....	83
Tabela 11: Correlações da expressão gênica e o hematócrito.....	85
Tabela12: Correlações da expressão gênica e número de plaquetas circulantes.....	87
Tabela 13: Correlações da expressão gênica e o aumento do tamanho do baço.....	90
Tabela 14: Correlação do perfil de resistência à morte celular e JAK2 V617F ⁺	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD – solução de ácido cítrico, citrato, dextrose

AG490 – inibidor específico para tirosina quinase JAK-2

AIF – *Apoptosis-inducing factor*

AKT – *Serine/threonine-specific protein kinase*

APAF-1 – *Apoptosis protease-activator factor 1*

ATP – Adenosina trifosfato

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 – Philadelphia chromosome translocation t(9;22) (q34;q11)

BH domain – *bcl-2 homology domain*

bid – BH3-interacting domain agonist

bik – bcl-2-interacting killer

bim – bcl-2-interacting mediator

bimel – bcl-2-like 11 (apoptosis facilitator)

bmf – bcl-2 modifying factor

bok – bcl-2-related ovarian killer

boo – bcl-2-like 10 (apoptosis facilitator)

c-DNA – *complementary DNA synthesized for reverse transcriptase*

c-KIT – *stem cell factor receptor*

c-MPL – receptor de trombopoetina

c-iap-1 – Baculoviral IAP repeat-containing 2, apoptosis inhibitor 1

c-iap-2 – Baculoviral IAP repeat-containing 3, apoptosis inhibitor 2

CARD – *Caspase activation and recruitment domain*

CD – *cluster de diferenciação*

CEE - Colônias eritróides endogénas

CFU-E - Unidades formadoras de colônias eritróides

Ct - *Threshold cycle*

CTH – Célula tronco hematopoética

CTC – Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HCFMRP-USP

DD - Death domain

del (20q) – Deleção no braço q do cromossomo 20

DED – *Death effector domain*

DIABLO – *Direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)- binding protein with low PI*

DISC – *Death-inducing signaling complex*

DMP – Doenças mieloproliferativas

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados

DSM – Doença sistêmica crônica

DR4 – *Death receptor 4 (TRAIL receptor 1)*

DR5 – *Death receptor 5 (TRAIL receptor 2)*

ECL – *Enhanced chemiluminescent*

EPOR – Receptor de eritropoetina

ERK1/2 – *Extracelular sinal-regulated kinases*

FADD - Proteínas adaptadoras FAS associada com DD

Fas/CD95 – Receptor de morte

fasl – *fas ligand*

FCFRP-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FERM – *Four point-one Ezrin Radixin Moesin domain*

FITC – *Fluorescein isothiocyanate*

flip – *Like caspase-8 (FLICE)-inhibitory proteins*

G1 – Fase *gap* da mitose

G-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos

G-CSF-R – Receptor para fator estimulador de colônias de granulócitos

GATA-1 – *GATA binding protein 1(globin transcription factor 1)*

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HB-SP – Hospital Brigadeiro de São Paulo-SP

HCFMRP-USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

HFS – Hypotonic fluorescent solution

Htr2 – *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A*

IDV – *Integrated density value*

IGF-I – *Insulin-like growth factor*

IGFBP – *Insulin-like growth factor binding protein*

I κ B – *Inhibitor NF- κ B*

IKK – *I κ B kinase complex*

IAPs – *Inhibitory apoptosis proteins*

IL-2 – Interleucina 2

INF- γ – Gama interferon

JAK – *Tyrosine kinases of the Janus kinase family*

JAK2 – *Janus Kinase 2*

JAK2 K539L – *Janus Kinase 2* mutada no aminoácido 539, troca de K por L

JAK2 V617F – *Janus Kinase 2* mutada no aminoácido 617, troca de V por F

JH2 – *JAK homology 2*

JH1 – *JAK homology 1*

JNK – *c-Jun-N-terminal kinase*

LLC - Leucemia linfóide crônica

LMA – Leucemias mielóides agudas

LMC – Leucemia mielóide crônica

LMCA – Leucemia mielóide crônica atípica

LMMC – Leucemia mielomonocítica crônica

LNC – Leucemia neutrofilica crônica

MAPK – *Mitogen-activating protein kinase*

mcl-1 – Myeloid cell leukemia

MFI – Mielofibrose idiopática

MOMP – *Mitochondrial outer membrane permeabilization*

NF- κ B – *Nuclear factor-kappa B protein*

NF-E2 – *Nuclear factor erythroid 2*

NK – Células *natural killer*

nox – *Proapoptotic BH3-only member of bcl-2*

Omi – *Omi stress-regulated endoprotease*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate buffer solution*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PI3K – *Phosphoinositol - 3 kinase*

PIDD – *p53-induced protein with death domain*

PIP – *Potassium voltage-gated channel*

PKB – *PDZ binding kinase*

PRV-1 – Receptor de Policitemia rubra vera

puma – *p53-up-regulated modulator of apoptosis*

PV – policitemia vera

PVDF - *Polyvinylidene difluoride*

RAS – *Ras association domain family*

RBC – *Red Blood Cells*

RIP – *Receptor-interacting protein*

RNA – Ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

S – Fase de síntese de DNA na mitose

SCF – *Stem cell factor*

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SHE/LEC – Síndrome hipereosinofílica/Leucemia eosinofílica crônica

SH2 – *SH2B adaptador protein 1*

SHC – *Src homology 2 domain-containing) transforming protein*

siRNA – *short interfering RNA*

SMAC – *Second mitochondria-derived activator of caspases*

SOCS – *Supressor of cytokine signaling*

SPC – Sangue periférico do controle

SPH2 – *Src homology 2 domain-containsin protein tyrosine phosphatase 2*

SP – Sangue periférico

STAT – *Signal transducers and activators of transcription*

TA – Temperatura de anelamento do *primer*.

TE – Trombocitemia essencial

TMO-HCFMRP-USP – Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

TNF – *Tumor necrosis factor*

TNF-R – *Tumor necrosis factor receptor*

TPO – Trombopoetina

Traf2 – *TNF receptor associating fator-2*

TRAIL – *TNF related apoptosis-inducing ligand*

TRADD – Proteínas adaptadoras TNFR1 associada com DD

X-IAP – *Linked inhibitor of apoptosis protein*

I. INTRODUÇÃO

Doenças Mieloproliferativas crônicas (DMPC) são neoplasias hematológicas clonais, nas quais há proliferação de uma ou várias linhagens mielóides (DELHOMMEAU et al., 2007). Caracterizam-se pela independência ou hipersensibilidade dos progenitores hematopoéticos a numerosas citocinas (SPIVAK, 2004; PRCHAL, 2005). As bases moleculares da maioria das DMPC são desconhecidas, mas conforme 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 DMPC clássicas: Leucemia Mielóide Crônica (LMC), Policitemia vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose Idiopática (MFI), e o grupo das DMPC menos frequentes: Leucemia Neutrofílica Crônica (LNC), Síndrome Hipereosinofílica/Leucemia Eosinofílica Crônica (SHE/LEC). Há um outro grupo, das DMPC não classificadas, com características intermediárias entre as DMPC e síndromes mielodisplásicas: Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC), Doença Sistêmica dos Mastócitos (DSM), e Leucemia Mielóide Crônica Atípica (LMCA) (DELHOMMEAU et al., 2006; LEVINE et al., 2007).

A policitemia vera (PV) é uma doença clonal que se origina de uma alteração na célula tronco hematopoética multipotente causando acúmulo de eritrócitos, leucócitos e plaquetas morfológicamente normais e seus precursores (GRUPPO ITALIANO STUDIO POLICITEMIA, 1995), na ausência de estímulo definido, sendo, portanto, considerada uma doença mieloacumulativa (SPIVAK, 2002).

Essa entidade nosológica é a mais comum das policitemias primárias e afeta aproximadamente duas em cada 100.000 pessoas por ano (SPIVAK, 2002).

De acordo com a classificação da OMS, o diagnóstico da PV é determinado pela presença das seguintes alterações: 1) no sangue periférico: eritrocitose, leucocitose, trombocitose, níveis séricos diminuídos de eritropoetina (EPO) e escore de atividade de

fosfatase alcalina aumentado; 2) na medula óssea: hiper celularidade, colônias eritróides endógenas (CEE - colônias eritróides) EPO-independentes, cromossomo Philadelphia (Ph) negativo e *bcr-abl* negativo (VARDIMAN, HARRIS, BRUNNING, 2002).

Com 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), estes critérios foram reavaliados e alterados. Segundo os novos critérios de diagnóstico (SILVER et al., 2007), os pacientes com PV devem apresentar as seguintes alterações: aumento de massa de células vermelhas ou hematócrito $\geq 60\%$, detecção da presença da mutação V617F do gene da JAK2 e/ou contagem de plaquetas superior a $400 \times 10^9/L$.

Para pacientes sem alteração no gene da JAK2, os seguintes critérios foram propostos:

1. Aumento da massa de RBC determinada por Cr^{51} inferior ao hematócrito $\geq 60\%$.
2. Ausência de policitemia secundária, o que implica em nível sérico de EPO $< 5U/mL$.
3. Somados a três ou mais dos seguintes critérios:
 - 3.1. plaquetas acima de $400 \times 10^9/L$;
 - 3.2. glóbulos brancos acima de $12 \times 10^9/L$;
 - 3.3. esplenomegalia;
 - 3.4. histologia de medula óssea consistente com PV;
 - 3.5. anormalidades cromossômicas.

A história natural da PV não foi completamente definida, nenhum critério de estadiamento e nem os fatores que afetam o prognóstico foram estabelecidos.

Em 1954, foi relatado que a doença se desenvolve passando por três estágios clínicos. Começa com uma fase assintomática, prossegue para uma fase compensada ou inativa e, finalmente evolui para uma fase de exaustão (*spent phase*) ou fase da metaplasia mielóide

pós-policitêmica. Nos últimos cinquenta anos, este tema foi pouco debatido, sendo bem estabelecido que PV possa ser agravada por anemia, mielofibrose e metaplasia mielóide, embora a frequência e a significância clínica destas complicações raramente tenham sido verificadas. Devido às limitações dos dados da história natural, o uso de termos como “spent”, “estacionária” deve ser abandonado em favor de descrições baseadas em observações quantitativas, prospectivas e biologicamente seguras (SPIVAK, 2002).

Um estudo do *Gruppo Italiano Studio Policitemia* (1995), realizado com 1213 pacientes seguidos por 20 anos, apontou que, ao diagnóstico, a maioria dos pacientes (77%) tinha entre 40 e 70 anos e 20% mais de 70 anos, 55% eram homens e 45% mulheres. A sobrevida média dos pacientes foi de 15 anos e a complicação mais frequente foi trombose venosa ou arterial, afetando 41% dos pacientes.

Tratamento citoreduutivo da hiperviscosidade sangüínea por flebotomia ou quimioterapia reduz substancialmente os eventos trombóticos e melhora a sobrevida. Entretanto, a trombose permanece a principal causa de morte e o uso de agentes citostáticos é associado ao desenvolvimento de cânceres secundários. Hidroxiuréia, α -interferon ou mesmo bussulfano têm sido usados para suprimir hematopoese nesses pacientes (GRUPPO ITALIANO STUDIO POLICITEMIA, 1995; SPIVAK, 2002).

Em alguns casos, a terapia é efetuada com a droga imidazoquinazoline (anagrelide), um antiagregante plaquetário, que inibe a maturação dos megacariócitos, controlando a trombocitemia (GRUPPO ITALIANO STUDIO POLICITEMIA, 1995; SPIVAK, 2002) e, nos casos de baixo risco, ácido acetilsalicílico como profilaxia para trombose.

O papel dos marcadores moleculares no diagnóstico e desenvolvimento das DMPC foi discutido extensivamente por renomados pesquisadores da área, como Heiki Pahle e Jerry L. Spivak, no Terceiro Congresso Internacional sobre Síndromes Mieloproliferativas e Mielodisplásicas (*Third International Congress on Myeloproliferative and Myelodysplastic*

Syndromes). Houve consenso de que quatro marcadores, a saber, a mutação pontual JAK2 V617F, a superexpressão de mRNA PRV-1 em granulócitos, a reduzida expressão de Mpl e a formação de colônia eritróide endógena (CEE), estão presentes na maioria dos pacientes com PV e relacionados aos processos de indução de doença. Nem todos são simultaneamente encontrados em todos pacientes, mas a combinação entre eles teria significância particular no diagnóstico e prognóstico das DMPC. A presença da mutação JAK2 V617F, a superexpressão de mRNA PRV-1 e o aparecimento de CEE são freqüentemente detectados em PV, TE e MFI, contudo a expressão diminuída de Mpl ocorre independentemente da presença ou não dos outros marcadores (SILVER et al., 2007).

Como as DMPC compartilham muitas características clínicas, de progressão e mimetismo fenotípico de PV, TE e MFI, a distinção entre as três desordens e outras doenças hematológicas torna-se difícil. Por essa razão, a OMS, preconizou a concentração de hemoglobina como o parâmetro a ser utilizado para determinar a eritrocitose, considerada a única característica que possibilita o diagnóstico diferencial de PV. Contudo, discute-se o uso da análise da massa de células vermelhas como a melhor escolha visto que a concentração de hemoglobina falha no diagnóstico em 65% dos pacientes (SILVER et al., 2007).

Estudos de alterações moleculares são essenciais para compreensão da fisiopatogenia da PV e na busca de novas ferramentas para o diagnóstico diferencial. A necessidade destas descobertas impulsiona cada vez mais pesquisas direcionadas à identificação da patogênese molecular e de alternativas terapêuticas mais eficazes visando à melhoria das condições de vida do paciente e futuramente possibilidade de cura.

I.1. Patogênese da policitemia vera

Policitemia vera é caracterizada por expansão inapropriada de células eritróides maduras, freqüentemente acompanhado por leucocitose e trombocitose moderada,

esplenomegalia e risco elevado de trombose arterial e venosa. Estudos citogenéticos da medula óssea são normais na maioria dos pacientes embora seja observado del (20q) e trissomia dos cromossomos 8 ou 9, em 20 a 30% dos pacientes (VAN ETTEN, SHANNON, 2004; BENCH et al., 2005). Apenas 10 a 25% dos pacientes com PV apresentam anormalidades cariotípicas ao diagnóstico e quando essas alterações aparecem tardiamente, na evolução da doença, podem significar uma transformação para mielodisplasia ou leucemia aguda. Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na etiologia e progressão da doença permanecem desconhecidos.

A anormalidade central na PV é a produção de eritrócitos independente de eritropoetina (EPO), o hormônio que normalmente regula a eritropoese, o que difere a PV de outras policitemias, como Policitemia Congênita Familiar Primária (CHEN, PRCHAL, 2006). Na PV, os níveis de EPO são baixos, os progenitores eritróides da medula óssea formam colônias EPO-independentes em culturas (CORREA, ESKINAZZI, AXELRAD, 1994) e a expressão de receptores de EPO e a sua habilidade de ligar-se a EPO são normais (GREEN, 1996).

As células da PV são hipersensíveis a diversos fatores de crescimento incluindo interleucina-3 (IL-3), fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF) e trombopoetina (TPO) sugerindo que a via de transdução de sinais pode estar alterada nestas células (DAÍ, KRANTZ, DESSYPRIS, 1992; DAÍ et al., 1994). A inabilidade para transduzir o sinal de TPO deve-se a uma severa redução ou ausência completa do seu receptor, c-mpl (MOLITERNO, HANKIS, SPIVAK, 1998).

Silva et al. (1998), mostraram que precursores eritróides de pacientes com PV expressam a proteína anti-apoptótica BCL-xL em proporção muito maior que precursores normais. Em adição, células mais maduras, que normalmente não expressam BCL-xL, têm altos níveis da proteína. O aumento da expressão desta proteína resultaria na resistência das

células CD34⁺ a apoptose e na diferenciação dessas células independentemente de EPO, sugerindo que o aumento do número de eritrócitos circulantes é ocasionado pelo acúmulo destas células e não pela mieloproliferação presente na PV.

Níveis aumentados de mRNA do receptor de superfície chamado PRV-1 (Policitemia Rubra Vera-1) têm sido demonstrado em granulócitos da maioria dos pacientes com PV, mas não em granulócitos de indivíduos normais ou com condições reativas (TEMERINAC et al., 2000). Kralovics et al (2003) relataram o aumento do RNAm de PRV-1 em 91% de 23 pacientes com PV. Este receptor é um membro da família de receptores uPAR/CD59 que tem diversas funções como interagir com ou ativar tirosina-quinase e estimular a via JAK/STAT (HOFFMAN, RAVANDI-KASHANI, 2005). É provável que PRV-1 também medeie transdução de sinais em células da medula óssea.

Na PV, o mecanismo que leva a hipersensibilidade a eritropoetina e a produção *in vitro* de colônias eritróides na ausência de citocinas, referidas como colônias eritróides endógenas (CEE), permanece desconhecido.

A descoberta da mutação V617F no gene da tirosina-quinase Janus Kinase 2 (JAK2 V617F) em pacientes com DMPC foi considerada o avanço mais importante para o entendimento da base molecular da policitemia vera (CHEN, PRCHAL, 2006). A atividade constitutiva desta tirosina quinase mutada resulta na constante sinalização de vias intracelulares implicadas na transdução de sinais (JAK-STAT), interferindo na sensibilidade dos progenitores hematológicos ao receptor de eritropoetina (EPOR), alterando os processos de proliferação, diferenciação e morte celular por apoptose (DELHOMMEAU ET AL., 2006; LEVINE et al., 2007).

Inibidores da via JAK2 impedem a diferenciação eritróide, na PV (UGO et al. 2004). Essa observação foi confirmada posteriormente por Jamieson et al. (2006), que demonstraram que as colônias de células portadoras da mutação JAK2 V617F comparadas às colônias sem a

mutação apresentavam maior sensibilidade ao inibidor específico para JAK2 estudado por este grupo. Jamieson et al. (2006), relataram ainda diferenças qualitativas e quantitativas nas características da célula tronco hematopoéticas (CTH) JAK2 V617F em PV quando comparadas às células de controles normais. Os pacientes portadores da mutação têm número aumentado de células com fenótipo de CTH e expansão de progenitores mielóides, que ainda podem apresentar tamanho e forma alterada, e potencial de diferenciação em linhagem eritróide distorcido.

Corroborando com esses dados, James et al. (2005) demonstraram, por meio de um experimento utilizando RNA de interferência (siRNA, *short interfering RNA*) capaz de diminuir a expressão do gene e da proteína JAK2, que JAK2 tem papel central na formação das colônias eritróides endógenas (CEE).

Janus kinase 2 (JAK2) é uma das enzimas que compõe o grupo de quatro tirosina-quinases citoplasmáticas (JAK), que se liga a receptores de citocinas, no seu domínio FERM (4.1 *Ezrin Radixin Moesin* – like domain), essencial para sua ligação com seguimentos proximais de membrana do domínio citosólico de EPOR (Figura 1a) (LU et al., 2005; DELHOMMEAU et al., 2006). Esta proteína possui papel chave na transdução de sinais para receptores homodiméricos tipo 1 como eritropoetina (EPOR), receptor de G-CSF e c-Mpl, receptores heteroméricos tipo 1 e 2 como gp130 e receptores da família IL-3, receptores IFN- γ , e na sinalização por c-KIT (WITTHUHN et al., 1993; DELHOMMEAU et al., 2006, VAINCHENKER, DELHOMMEAU, VILLEVAL, 2007).

A ligação das citocinas aos seus receptores induz a fosforilação dos resíduos de tirosina de duas moléculas de proteínas JAK2, que atuam no recrutamento e fosforilação de *Phosphoinositol - 3 kinase* (PI3K), *Ras association domain family* (RAS) e *Signal transducers and activators of transcription* (STAT) 5, regulando os processos de proliferação, diferenciação e participam nos mecanismos de maturação e tráfego de receptores

homodiméricos do tipo 1, EPOR e c-Mpl, conferindo maior estabilidade aos receptores ligados à membrana plasmática e sua reciclagem (Figura 1b). No ciclo celular de células hematopoéticas, o papel da JAK 2 está associado à promoção da transição da fase G1 para S com aumento de expressão da ciclina D2 e diminuição da p27 (VAINCHENKER, DELHOMMEAU, VILLEVAL, 2007).

Uma mutação pontual, no braço curto do cromossomo 9 (9p), em um único nucleotídeo na posição 1849 (G para T) no gene da JAK2 resulta na substituição do aminoácido valina pelo aminoácido fenilalanina (JAK2 V617F) na posição 617 do domínio JH2 da JAK2 (Figura 1b) (NUSSENZVEIG et al., 2007). A mutação no domínio JH2 (JAK homology 2) impede o efeito auto-inibitório na ativação da tirosina-quinase, função exercida pelo domínio JH2 sobre o domínio quinase JH1, o que leva a fosforilação constitutiva no sítio de ativação (*activation loop*) Y1007 e induz o desencadeamento das vias de sinalização JAK2/STAT5, MAPK/ERK1/2 e PI3K/AKT. A ativação destas vias promove a hipersensibilidade ou independência a citocinas, em linhagens de células dependentes de fatores Ba/F3, (JAMES et al., 2005; DELHOMMEAU et al., 2006) e induz eritrocitose em camundongos, após transplante de células da medula óssea com JAK2 V617F (JAMES et al., 2005).

A dependência de receptores de citocinas homodiméricos do tipo 1 pode explicar a atividade preferencial da JAK2 V617F em células da linhagem mielóide, a saber, eritrocítica (EPOR), granulocítica (G-CSF-R) e megacariocítica (c-Mpl), mas não na linhagem linfóide que não possui este tipo de receptor. É necessária a presença do receptor ativo para a transformação das células hematopoéticas devido à atividade constitutiva na via de sinalização JAK-STAT independente de fatores de crescimento ou demais hormônios (LU et al., 2005).

A mutação JAK2 V617F foi identificada, pelo método de reação em cadeia da

polimerase (PCR) na maioria dos pacientes com PV (>80%) (BAXTER et al., 2005; JAMES et al., 2005). Levine et al. (2005) identificaram a mutação em amostras de DNA de granulócitos de 121 de 164 pacientes (74%) com PV e Kralovics et al. (2005), em 83 de 128 pacientes (65%) com PV.

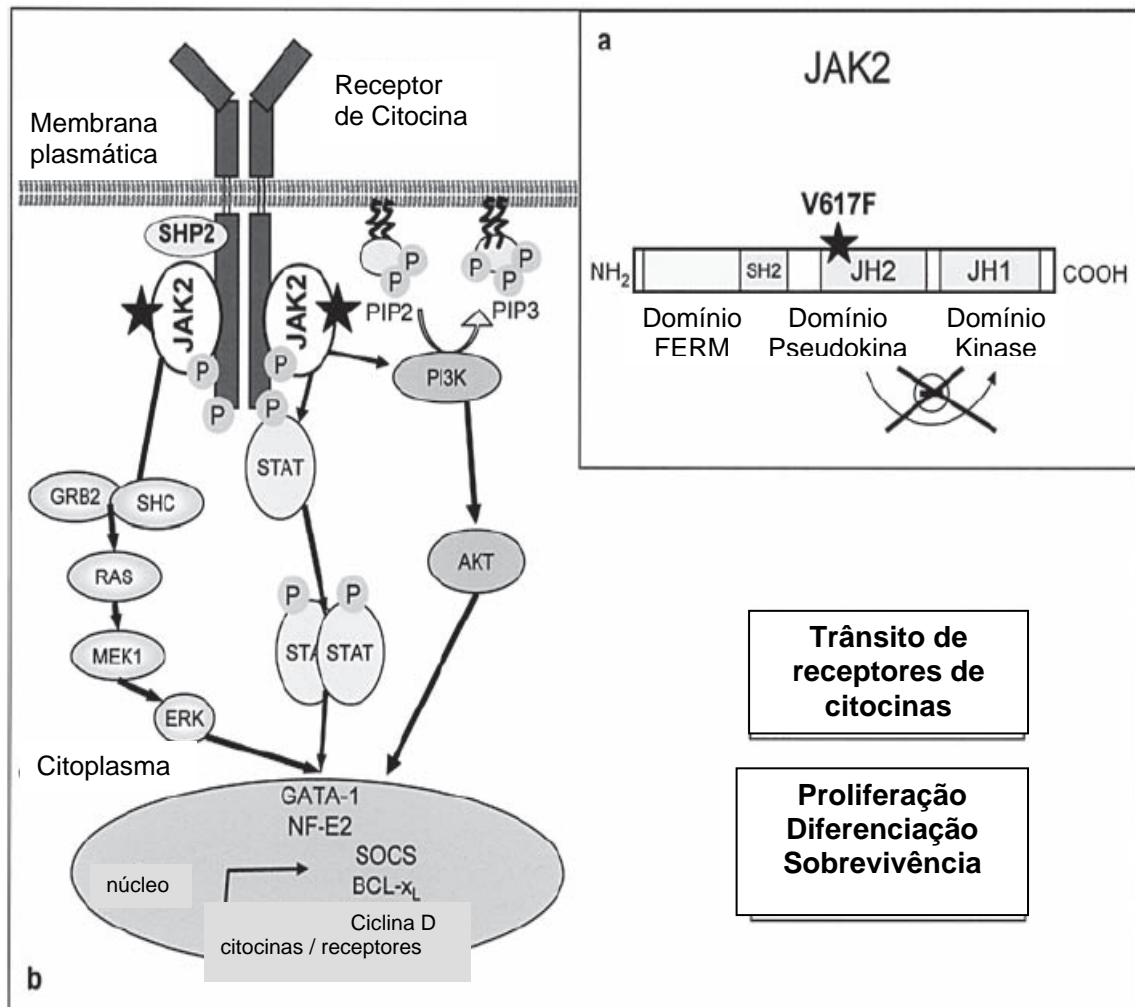


Figura 1a e b: Via de sinalização e estrutura da JAK2 V617F em Doenças Mieloproliferativas.

(Adaptado de DELHOMMEAU et al., 2006).

A importância da JAK2 V617F na patogênese da PV fica evidenciada pelos seguintes dados: 1. a maioria dos pacientes portadores de PV tem a mutação; 2. camundongos

transplantados com células de medula óssea que expressam JAK2 V617F desenvolvem eritrocitose e progridem tardiamente para mielofibrose, com comportamento similar à evolução natural de PV (JAMES et al., 2005) e 3. JAK2 V617F está envolvida nos dois principais eventos de PV, na hipersensibilidade a EPO e amplificação terminal das linhagens eritróides demonstrada *in vitro* usando células progenitoras da medula óssea (VAINCHENKER, DELHOMMEAU, VILLEVAL, 2007).

Segundo Delhommeau et al. (2006), as diferenças na frequência e nas características fenotípicas que envolvem a mutação JAK2 V617F nas DMPC 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. O estado policitêmico em pacientes portadores de PV ou MFI estaria relacionado com alta atividade quinase de JAK2 V617F e o estado trombocitêmico de pacientes com TE com baixa atividade. A maioria dos pacientes com PV apresenta progenitores hematopoéticos com clones homozigóticos para a mutação, contudo, em portadores de TE, 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.

Outras explicações têm sido propostas para justificar as diferenças do papel da JAK2 V617F nas DMPC. Eventos moleculares adicionais parecem interferir na atividade da JAK2 kinase, como: a citogenética, dentre eles a anormalidade mais frequente nos pacientes com PV, a del (20q), e a trissomia do cromossomo 9, que aumenta atividade tirosina-quinase de JAK2 V617F (VAINCHENKER, DELHOMMEAU, VILLEVAL, 2007); sexo, importante modificador genético; a capacidade de regulação das fosforilases e proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS); polimorfismos e mutação de receptores de citocinas, entre outros (DELHOMMEAU, 2006).

Ainda nesse contexto, recentemente foi descoberta outra mutação no exon 12 do gene

Janus Kinase 2 (JAK2), ligada aos domínios SH2 e JH2, que confere maior atividade tirosina-quinase constitutiva ligada à sinalização de receptores EPO e fatores de crescimento quando comparada a JAK2 V617F. Essa nova mutação, a JAK2 K539L, leva a eritrocitose e leucocitose, com contagens de leucócitos e plaquetas inferiores a JAK2 V617F, entretanto com aumento dos níveis de hemoglobina. Essas alterações favorecem a sinalização intracelular de células da linhagem eritrocítica, portanto, parecem ser restritas ao pacientes com PV (VAINCHENKER, DELHOMMEAU, VILLEVAL, 2007; SCOTT, et al. 2007).

Nussenzveig et al. (2007) demonstraram a presença de CEE mesmo na ausência da mutação no gene da JAK2, o que corrobora com a hipótese da existência de mecanismos celulares e moleculares alternativos responsáveis pela fisiopatologia e progressão da PV.

Pelo exposto, verifica-se que os processos celulares que conduzem ao aparecimento e desenvolvimento dessa doença ainda permanecem desconhecidos, visto que a mutação JAK2 V617F parece não ser evento primário que resulta na doença. Confirma-se assim a necessidade de mais estudos para compreender a base molecular e progressão da PV. Essas investigações visam à descrição de novos alvos terapêuticos e de marcadores de prognóstico para PV e outras DMPC.

I.2. Apoptose e policitemia vera.

Apoptose, processo fisiológico de morte celular programada, desempenha importante função na homeostase dos diferentes organismos celulares. É um mecanismo altamente conservado, envolvido na manutenção da integridade, do número de células e no posicionamento celular nos tecidos de diferentes compartimentos (JIN, EL-DEIRY, 2005). A desregulação desse processo pode causar várias doenças incluindo neoplasias, doenças auto-imunes e desordens neurodegenerativas (YAN, SHI, 2005). Conhecer os mecanismos de sinalização da morte celular e seus pontos de regulação é essencial para a compreensão da

patogenia de doenças que resultam na alteração destas vias e para a busca por alternativas terapêuticas eficientes.

O fenômeno de apoptose celular pode ser disparado por uma variedade de estímulos fisiológicos, patológicos ou citotóxicos. Quando iniciada, a apoptose, promove a ativação de eventos moleculares que culminam com a ativação de proteases, denominadas caspases (*cysteine aspartate-requiring proteinases*) (JIN, EL-DEIRY, 2005; SHI et al., 2002).

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 dismantelamento 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.

As células em apoptose têm morfologia característica como pregas na membrana plasmática, encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação dos corpos apoptóticos e exposição de moléculas sinalizadoras como fosfatidilserinas. Essas últimas são importantes para que a célula apoptótica seja englobada ou fagocitada por macrófagos, evitando a ocorrência de processo inflamatório local (JIN, EL-DEIRY, 2005).

Em células de mamíferos, a apoptose ocorre principalmente por meio da ativação de duas vias de sinalização: a extrínseca, mediada pelos receptores de morte, e a intrínseca, mitocondrial, que são desencadeadas, respectivamente, por estímulos oriundos dos meios extracelulares e intracelulares.

A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de morte FAS (FAS/CD95), TNF-R1 e R2 (*tumor necrosis death receptor*), TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand receptors) R1 (DR4) e R2 (DR5), uma família de proteínas transmembrânicas, que

apresentam um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular denominado DD (*death domain*), responsável pela transdução do sinal apoptótico. A interação destes receptores com seus respectivos ligantes induz trimerização dos receptores levando ao recrutamento de proteínas adaptadoras, como FAS associada com DD (FADD) e TNFR1 associada com DD (TRADD), e proteínas que interagem com receptor (RIP, *receptor-interacting protein*), que se ligam aos receptores de DD. A proteína FADD contém um domínio efetor da morte (DED, *death effector domain*) com homologia ao domínio DED da pró-caspase-8 ou -10, formando um complexo chamado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), que promove a auto-ativação da caspase-8 que, por sua vez, atua na ativação da caspase 3, 6 e 7, desencadeando eventos apoptóticos seguidos pela formação de corpos apoptóticos (morte celular) e fagocitose por macrófagos (Figura 2) (JIN, EL-DEIRY, 2005; YAN, SHI, 2005).

A via intrínseca é desencadeada pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular, como irradiações, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular, que convergem para a mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo c, AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) e 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*) que, na presença de ATP/dATP, induz a formação do complexo multimérico chamado “apoptosomo”. O apoptosomo medeia a ativação da caspase iniciadora, caspase-9, que subsequentemente ativa as caspases executoras, caspases -3, -6 e -7, responsáveis pelo desmantelamento celular característico da apoptose (Figura 3) (WANG, 2001; YAN ; SHI, 2005).

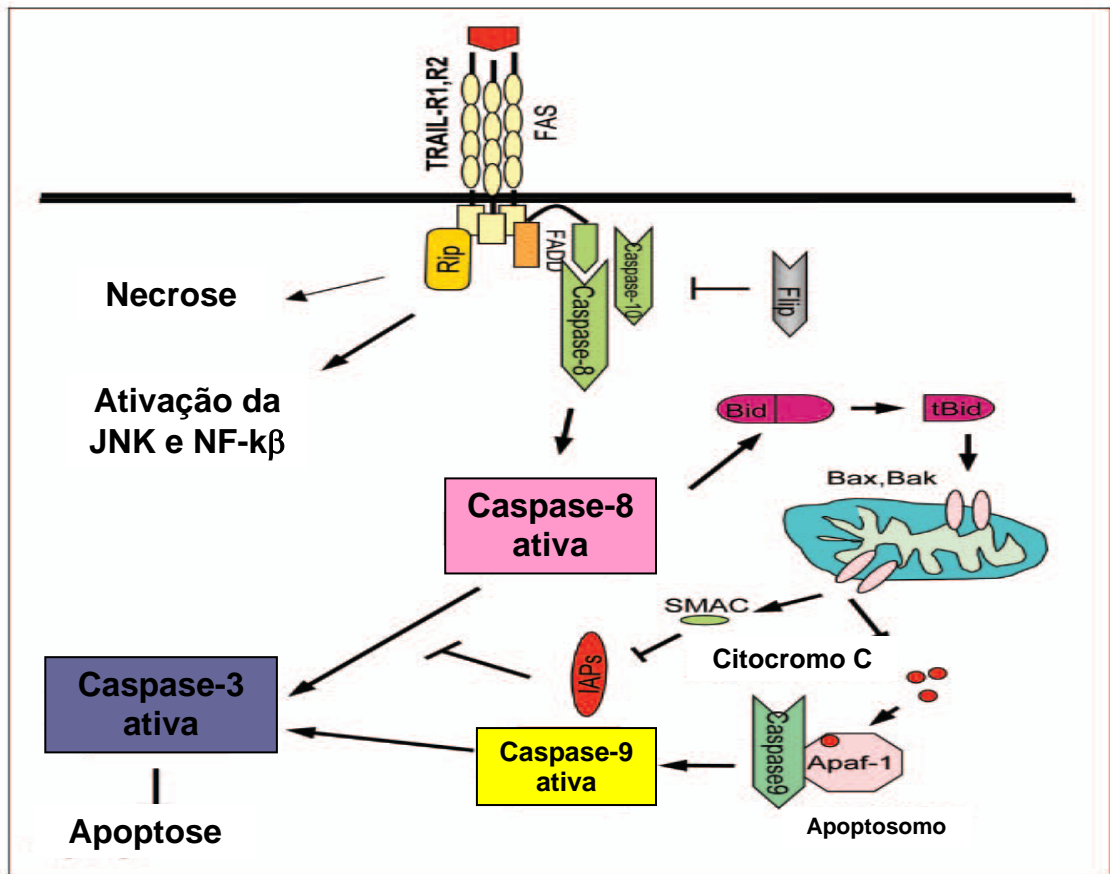


Figura 2: Via extrínseca da apoptose celular (adaptada de JIN; EL-DEIRY, 2005)

As vias extrínseca e intrínseca convergem para a ativação da caspase 3, 6 e 7 e subseqüentemente, de outras proteases e nucleases que comandam os eventos terminais da apoptose (JIN, EL-DEIRY, 2005).

A regulação deste processo é realizada por fatores inibidores e ativadores da cascata apoptótica, destacando-se os receptores de morte (*death receptors*) pertencentes à família do receptor de TNF, as proteínas pertencentes às famílias Bcl-2, IAPs, FLIPs, caspases e fatores de supressão de tumores com p53 (NOXA e PUMA), dentre outros (HALE ET AL., 1996; BORNER, 2003). O equilíbrio das interações entre as proteínas pró- e anti-apoptóticas definem a ocorrência da morte celular.

Os membros da família Bcl-2 dividem-se em três categorias: a) os capazes de integrar sinais de sobrevivência pelas moléculas anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1 e A1); b) os capazes de integrar sinais de morte celular, pelas moléculas pró-apoptóticas multidomínio BH (BAK, BAX, BCL-xS, BIK, BIMEL, BMF, BOK E BOO) que compartilham os domínios BH1, BH2 e BH3; c) moléculas pró-apoptóticas BH3-only (BAD, BID E BIM) que compartilham apenas o domínio BH3 (SHARPE et. al, 2004, BORNER, 2003).

As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 ligam-se e estabilizam a membrana externa da mitocôndria impedindo a liberação do seu conteúdo, evitando assim os eventos desencadeadores do desmantelamento celular. As proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK ativam-se quando interagem com a molécula BID truncada, liberada pela clivagem da proteína BID pela caspase-8, inibindo as proteínas anti-apoptóticas. Esta ligação desestabiliza a membrana mitocondrial liberando fatores apoptogênicos como citocromo c, AIF, SMAC/DIABLO, Omi/Htr2 e Endonuclease G, que iniciam a morte celular programada (Figura 3) (JIN, EL-DEIRY, 2005).

As proteínas da família dos inibidores de apoptose, as IAP (CIAP-1, CIAP-2, XIAP e SURVIVINA), interferem na formação do complexo APAF-1/caspase -9, inibindo ativação das caspases-3 e -9 e a apoptose. No entanto, sofrem também a regulação por meio da interação com o SMAC (HUANG, 2002, SHI, 2002). Acredita-se que AIF e Endonuclease G contribuam para modificações nucleares como condensação da cromatina.

A via extrínseca da apoptose celular é regulada pela molécula c-FLIP (*caspase -8 like FLICE inhibitory proteins*), a qual possui uma homologia estrutural com a caspase -8. Nesse sentido, c-FLIP compete com a caspase -8 pelo sítio de ligação ao FADD impedindo a formação do complexo DISC e o desencadeamento da apoptose (Figura 2) (JIN, EL-DEIRY, 2005).

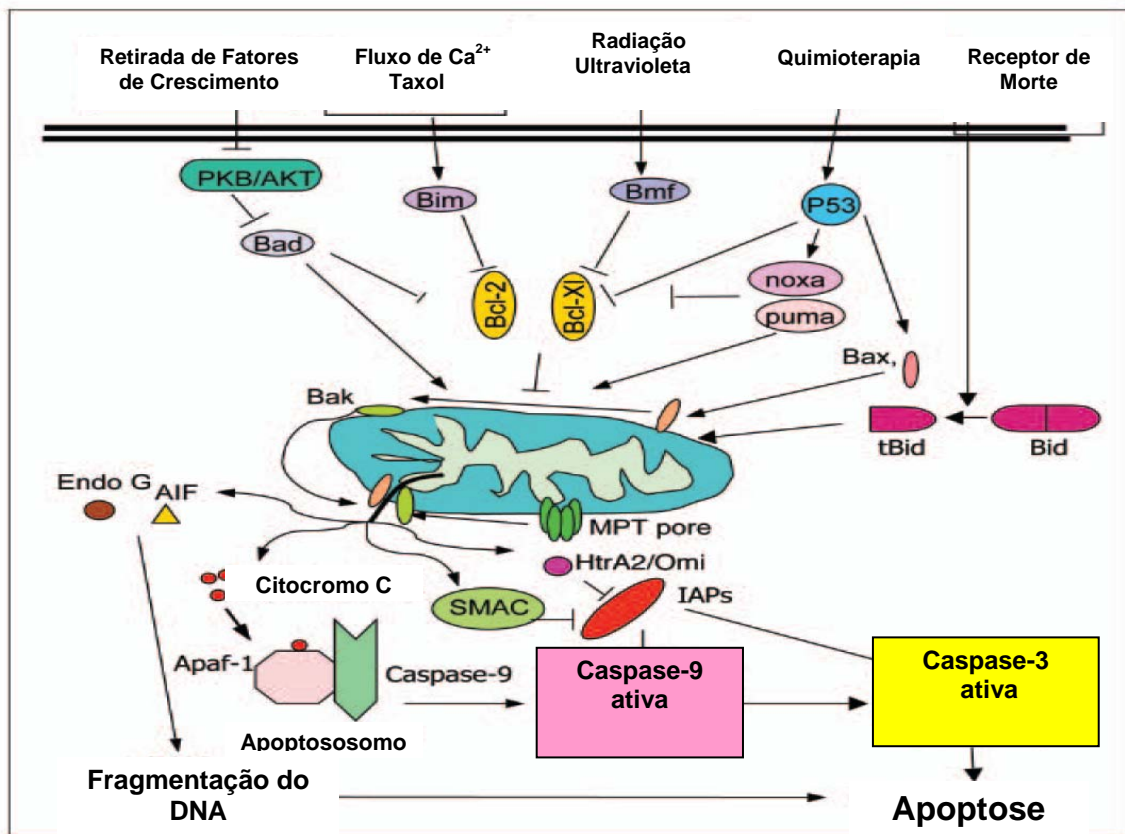


Figura 3: Via Intrínseca de sinalização mitocondrial da apoptose. (Jin, El-Deiry, 2005)

A apoptose pode ser ainda resultante da ativação do gene supressor de tumor p53 na qual participam ativamente as moléculas reguladoras (JIN, EL-DEIRY, 2005).

Em eritrócitos imaturos normais, a ativação da caspase estimulada pela ligação de FAS-FASL às proteínas adaptadoras FADD, pode resultar em clivagem do principal fator de transcrição da linhagem eritrocítica, GATA-1, evento que conduz para inibição reversível da proliferação e diferenciação celular ou apoptose dependendo dos níveis de EPO presentes no microambiente. Desta forma, a interação dos receptores com seus ligantes atua como um mecanismo de “feedback” que ajusta a produção de eritrócitos maduros em resposta às necessidades fisiológicas (ZEUNER et al., 2006).

Zeuner et al. (2006) demonstraram que eritroblastos de PV são mais resistentes à inibição da eritropoese e a clivagem de GATA-1 mediadas por ativação ineficiente das

caspsas executoras por receptores de morte, presença de AKT e ERK fosforilados mesmo na ausência de EPO, além do aumento de FLIP, molécula inibidora da ativação da caspase -8, o que confirma a ativação destas vias de proliferação e sobrevivência. Esta resistência foi mais significativa em portadores homozigóticos da mutação JAK2 V617F.

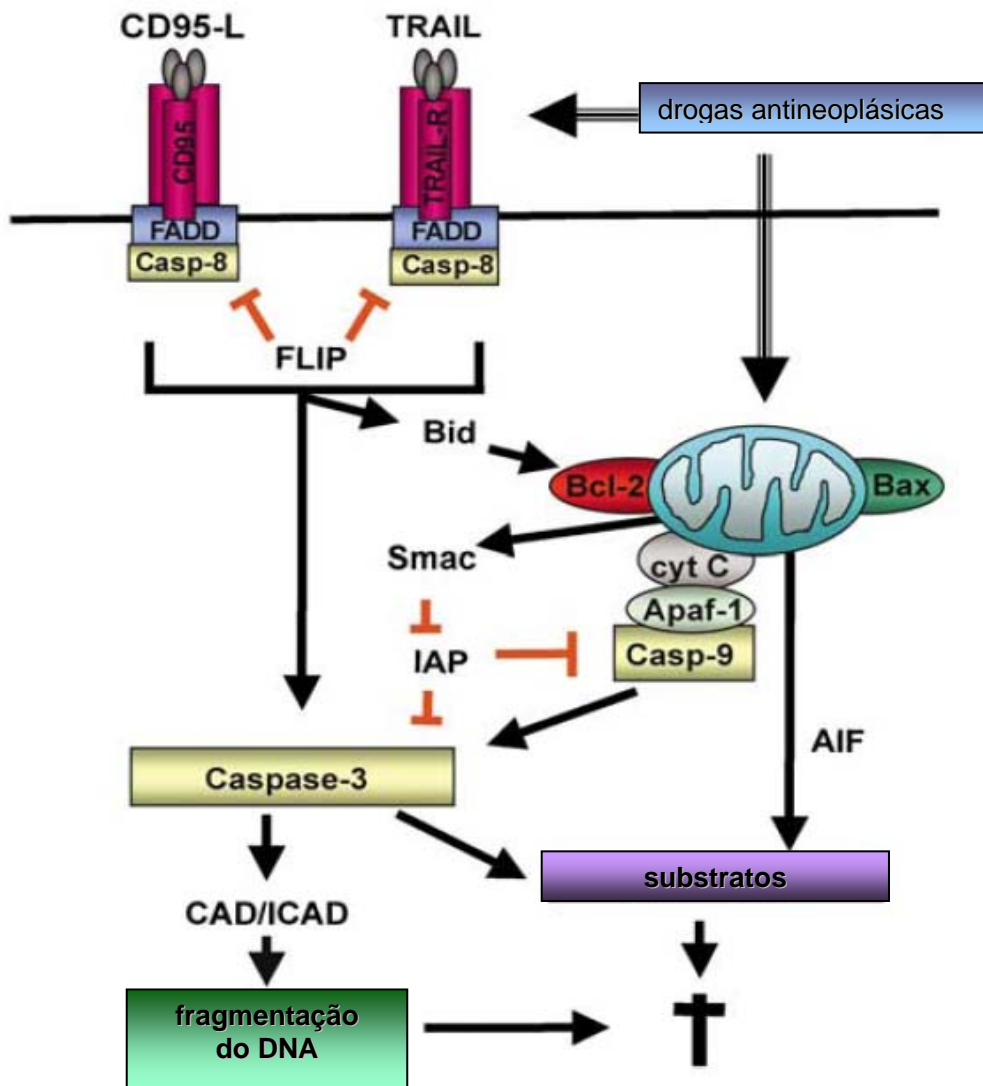


Figura 4: Esquema de ativação da apoptose pela via receptores de morte celular e pela via mitocondrial (adaptado de Fulda, Debatin, 2006).

Como citado anteriormente, a ausência ou diminuição da expressão das proteínas pró-apoptóticas está associada ao aparecimento de infecções recorrentes, doenças hematológicas, autoimunes e resistência às drogas citotóxicas. Em contraste, a exacerbação dessa expressão

por meio da utilização de radioterapia, antineoplásicos, imunoterápicos no tratamento de tumores sólidos ou leucemias conduz à cura de doenças (SHARMA et al., 2000). Anormalidades concernentes à expressão das proteínas anti-apoptóticas também culminam em doenças. A elucidação dessas alterações pode colaborar com a escolha e/ou modulação do tratamento das doenças. Na PV, um defeito no controle de morte celular por apoptose pode causar o acúmulo de células eritróides sem a necessidade de EPO (FERNANDEZ-LUNA, 1999).

Nas Leucemias Linfóides Crônicas (LLC) do tipo B, o antígeno FAS está expresso em níveis mais baixos do que o BCL-2, enquanto que nas Leucemias Mielóides Agudas (LMA) dos tipos M2 e M3, o antígeno BCL-2 está diminuído em relação ao FAS. Estes dados podem explicar, pelo menos em parte, porque os pacientes portadores de LMA-M2 e M3 têm uma alta taxa de remissão quando tratados. Outro dado a ser ressaltado, é o fato de que a citotoxicidade contra células tumorais, mediada pelas células T e NK, também pode ser exercida pela via de ativação do sistema FAS-FASL. É importante mencionar que células tumorais podem evadir da resposta imune por meio da expressão de FASL. Tem sido proposto que células tumorais que secretam ou expressam o antígeno FASL podem promover a apoptose de células efectoras, impedindo que estas atuem na erradicação do clone tumoral. O antígeno FASL presente nas células tumorais, quando ligado ao antígeno FAS das células efectoras, conduziria a apoptose da célula efectora, diminuindo o pool circulante de células da resposta imune. Daí a necessidade da observação do nível de expressão dos antígenos FAS nas células da resposta imune e FASL nas células CD34⁺ malignas (BUZYN et al., 1999).

As expressões aumentadas do FASL em células tumorais e leucêmicas constituem um dos mecanismos de escape dos clones leucêmicos à resposta imune anti-tumoral. Estes antígenos estão presentes na superfície de diferentes tipos de células neoplásicas, como por exemplo, células de melanoma, câncer de cólon, hepatocarcinoma, mieloma múltiplo e

leucemias (BUZYN et al., 1999; ZEYTUN et al., 1997). Estas células tumorais e leucêmicas podem se ligar a linfócitos T ou células NK ativadas que expressam o antígeno Fas e conduzi-las a apoptose, promovendo, desta forma, a inativação da resposta imune anti-tumoral.

Como já citado, os progenitores eritróides PV são hipersensíveis a diversos fatores de crescimento incluindo IL-3, GM-CSF, SCF e IGF-I (*Insulin-like growth factor*) (DAÍ, KRANTZ, DESSYPRIS, 1992; DAI et al., 1994; CORREA, ESKINAZZI, AXELRAD, 1994). Na ausência de IGF-1 exógeno, o nível basal de tirosina fosforejada do receptor de IGF-1 é muito maior em PV do que em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normais. IGF-1 circula ligado a proteínas específicas (IGFBP-1 a 6) que regulam sua disponibilidade e atividade. Em pacientes com PV, os níveis de IGFBP-1 são quatro vezes maiores que os controles normais. IGFB-1 é capaz de estimular formação de *burst* eritróide por aumentar a sensibilidade da célula ao IGF-1 (MIRZA, EZZAT, AXELRAD, 1997).

IGF-1 age sobre progenitores hematopoéticos inibindo apoptose e este efeito na sobrevivência da célula requer a atividade do efeito intercelular fosfoinositídeo 3-quinase (PI3-kinase) (KELLEY et al., 1998). PI3 – kinase fosforila inositol lipídeos que agem como segundos mensageiros para diversos alvos, incluindo a serina-treonina AKT quinase. Ativação de AKT fosforila a proteína apoptótica BAD, prevenindo a ligação com a proteína anti-apoptótica BCL-_{xL}, um mecanismo que pode levar a inibição de apoptose (DOWNWARD, 1998). Dai, Chung, Krantz (2005) demonstraram um aumento marcado na fosforilação de AKT/PKB nas unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) em PV, em resposta a SCF e EPO, quando comparada a CFU-E normal.

O gene *bcl-xL* é expresso nos estágios dependentes de EPO da diferenciação eritróide normal. Entretanto, células eritróides PV cultivadas na ausência de EPO, expressam *bcl-xL* em todos os estágios de diferenciação e os eritroblastos mais maduros expressam níveis mais altos de *bcl-xL*. Assim, a expressão desregulada deste gene pode contribuir para a sobrevivência da

linhagem eritróide EPO-independente na PV. Durante a eritropoese, um dos principais alvos de JAK2 é a proteína transdutora de sinais e ativadora da transcrição, a STAT5. Após a fosforilação pela JAK2, a proteína STAT5 dimeriza-se e transloca para o núcleo onde é regulada a transcrição de genes alvos implicados em proliferação celular e sobrevivência, entre eles a proteína anti-apoptótica BCL-_{xL} (GARÇON et al., 2006, SOCOLOVSKY et al., 1999). STAT 5 é o principal fator que medeia a ação EPO na transcrição de genes em células eritróides e pode transativar o promotor *bcl-x* em resposta a EPO nos progenitores eritróides (ODA et al., 1998; SILVA et al., 1998).

Socolovsky et al. (1999), ainda mostraram a relevância de STAT5, uma vez que camundongos JAK2^{-/-} tiveram um defeito grave na eritropoese, em consequência da inativação de STAT5, o que ocasionou anemia severa e a morte dos animais no útero da mãe.

A mutação JAK2 V617F está implicada nos efeitos de superexpressão de *bcl-xL*, já que há ativação constitutiva de STAT5. Garçon et al. (2006) investigaram a importância das vias STAT5 / *bcl-xL* na formação de CEE, e mostraram que a indução de GpA em células CD36⁺/GpA⁻ transfectadas com seqüências codificadoras de STAT5 e *bcl-xL* humano foi maior que em células normais e houve redução drástica da indução a clonalidade de CEE por inativação de STAT5 e superexpressão de *bcl-xL* por meio de RNAsi em células progenitoras CD36⁺, ambos ensaios conduzidos na ausência de EPO.

A associação da patogênese e prognóstico da PV com as proteínas reguladoras do processo de apoptose tem sido pouco investigada. No entanto, como a célula precursora maligna presente na doença parece ser resistente a apoptose, esta abordagem precisa ser mais bem explorada, motivo pelo qual desenvolvemos o presente trabalho.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICHBERGER, K.J.; MAYERHOFER, M.; KRAUTH, M.T.; et al. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood*, New York: v. 105, n. 8, p. 3303 – 11, Apr. 2005

AMARANTE-MENDES, G.P.; MCGAHON, A.J.; NISHIOKA, W.K.; AFAR, D.E.; WITTE, O.N.; GREEN, D.R. Bcl-2-independent Bcr-abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with upregulation of Bcl-xL. *Oncogene*, Basingstoke: v. 16, p. 1383 – 90, Mar. 1998.

ANTIGNANI, A.; YOULE, R. J. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol*, Philadelphia: v. 18, p. 685 – 9, Dec. 2006.

BAROSI, G.; BERGAMASCHI, G.; MARCHETTI, M.; et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood*. New York: v. 110, n.12, p. 4030 – 6, Dec. 2007.

BAXTER, E.J.; SCOTT, L.M.; CAMPBELL, P.J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, London: v.365, p. 1054 – 61, Mar. 2005.

BENCH, A.J.; ERBER, W.N.; SCOTT, M.A. Molecular genetic analysis of hematological malignancies: I. Acute leukaemias and myeloproliferative diseases. *Clin Lab Haem*, Oxford: v.27, p. 148 – 71, Jun. 2005.

BORNER, C. The *Bcl-2* protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, Oxford: v.39, n.11, p.615 – 47, Jan. 2003.

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

BRIEN, G.; TRESKOL-BIEMONT, M.C.; BONNEFOY-BERARD, N. Downregulation of Bfl-1 protein expression sensitizes malignant B cell to apoptosis. *Oncogene*, Basingstoke: v. 26, p. 5828 – 32, Aug. 2007.

BRUMATTI, G.; WEINLICH R.; CHEHAB, C.F.; YON M.; AMARANTE-MENDES, G.P. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 e Bcl-xL following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Lett*, Amsterdam: v.541, p.57 – 63, Apr. 2003.

BUZYN, A.; PETIT, F.; OSTANKOVITCH, M. et al. Membrane-bound *fas* (Apo-1/CD95) ligand on leukemia cells: a mechanism of tumor immune escape in leukemic patients. *Blood*, New York: v. 94, n. 9, p. 3135 – 40, Nov. 1999.

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

CHEN, J; PRCHAL, J. T. Polycythemia vera and its molecular basis: an update. *Best Pract Res Clin Haematol*, London: v.19, n.03, p.387 – 97, Set. 2006.

CHENG, Q.; LEE, H.H.; LI, Y.; PARKS, T.P.; CHENG, G. Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-kappaB inhibition. *Oncogene*, Basingstoke: v. 19, p. 4936 – 40, Oct 2000.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, Cambridge: v. 18, n. 4, p. 157 – 164, Mar. 2008.

CORREA, P.N.; ESKINAZZI, 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*, New York, v. 83, n. 01, p. 99 – 112, Jan. 1994.

DAI, C.; CHUNG, I.J.; KRANTZ, S.B. Increased erythropoiesis in Polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt / PKB. *Exp Hematol*, Copenhagen: v. 33, p. 152 – 8, Feb. 2005.

DAI, C.H.; KRANTZ, S.B.; DESSYPRIS, E.N. Polycythemia vera. II. Hypersensitive of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cell to interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, New York, v. 80, n. 04, p. 891 – 9, Aug. 1992.

DAI, C.; KRANTZ, S.B.; GREEN, W.F. et al. Polycythemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression. *Br J Haematol*, Oxford: v. 86, n. 01, p. 12 – 21, Jan. 1994.

DEBATIN, K. M.; STAHNKE, K.; FULDA, S. Apoptosis in hematological disorders. *Semin Cancer Biol*, Philadelphia : v. 13, n. 2, p. 149 – 158, Apr 2003

DEL POETA, G.; BRUNO, A.; DEL PRÍNCIPE, M.I.; et al. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. *Curr Cancer Drug Targets*, Hilversum: v. 8, n. 3, p. 207 – 22, May 2008.

DELHOMMEAU, F.; PISANI, D.F., JAMES, C.; CASADEVALL, N.; CONSTANTINESCU, S.; VAINCHENKER, W. Oncogenic mechanisms in Myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci*, Birkhäuser Basel: v. 63, n. 24, p. 2939 – 53, Dec. 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*, New York: v. 109, n. 1, p. 71 – 7, Jan. 2007.

DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/ Akt. *Curr Opin Cell Biol*, Philadelphia: v. 10, p. 262-7, Apr. 1998.

ECONOMOPOULOU, C.; PAPPA, V.; KONTSIOTI, F. et al. Analysis of apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res*, New York: v. 32, n. 1, p. 61 – 9, Jan 2008.

FERNANDEZ-LUNA, J. Apoptosis and polycythemia vera. *Curr Opin Hematol*, Cambridge: v. 06, n. 02, p. 94 – 9, Mar. 1999.

FABREGAT, I.; RONCERO, C.; FERNÁNDEZ, M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int*, Oxford: v. 27, n. 2, p. 155 – 62, Mar 2007.

FINAZZI, G.; BARBUI, T. Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia*, London; v. 22, n. 8, p. 1494 – 502, Aug 2008.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, Basingstoke; v. 25, p. 4798 – 4811, Aug. 2006.

FULDA S, MEYER E, DEBATIN KM. Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO/Fas) induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme Inhibitory protein expression. *Cancer Res*, Chicago: v. 60, n. 14, p. 3947 – 56, Jun. 2000.

GANGAT, N.; STRAND, J.; LASHO, T.L.; et al. Cytogenetic studies at diagnosis in polycythemia vera: clinical and JAK2V617F allele burden correlates. *Eur J Haematol*. Copenhagen: v. 80, n. 3, p. 197 – 200, Mar. 2008.

GARÇON, L.; RIVAT, C.; JAMES, C. et al. Constitutive activation of STAT5 and *bcl-x_L* overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood*, New York: v.108, n. 05, p.1551-4, Sep. 2006.

GÉLINAS, C.; WHITE, E. BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes Dev*, Cold Spring Harbor: v. 19, p. 1263 – 8, Jun. 2005

GREANEY, P.; NAHIMANAB, A.; LAGOPOULOS, L.; et al. Fas agonist induces high levels of apoptosis in haematological malignancies. *Leuk Res*, Oxford: v. 30, p. 415 – 26, Abr. 2006.

GREEN, A.R. Pathogenesis of Polycythemia vera. *Lancet*, London: v. 347, p. 844 – 5, Mar. 1996.

GRUPPO ITALIANO STUDIO POLICITEMIA. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med*, Philadelphia: v.123, n.9, p.656 – 64, Nov. 1995.

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

HENSON, E. S.; JOHNSTON, J. B.; GIBSON, S. B. The role of TRAIL death receptors in the treatment of hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*, London; v. 49, n. 1, p. 27 – 35, Jan. 2008.

HOFFMAN R.; RAVANDI-KASHANDI F. Idiopathic myelofibrosis. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, et al, eds. *Hematology: Basic Principles and Practices*. 4th edition. Philadelphia, PA: Elsevier Scientific; p.1255 – 7, 2005.

HUANG, Z. The chemical biology of apoptosis. Exploring protein-protein interactions and the life and death of cells with small molecules. *Chem Biol*, London: v.9, n.10, p.1059 – 72, Oct. 2002.

HUSSEIN, K.; BOCK, O.; KREIPE, H. Histological and Molecular Classification of Chronic Myeloproliferative Disorders in the Age of JAK2: Persistence of Old Questions despite New Answers. *Pathobiology*, Basel; v.74, n. 2, p.72 – 80, Jun. 2007.

HYER, M. L.; SAMUEL, T.; REED, J. C. The FLIP-Side of Fas Signaling. *Clin Cancer Res*, Chicago; v.12, n.20, p. 5929 – 31, Oct. 2006.

INOUE, S.; WALEWSKA, R.; DYER, M. J. S.; COHEN, G. M. Downregulation of Mcl-1 potenciales HDCAi-mediated apoptosis in leukemic cells. *Leukemia*, London: v. 22, p. 819 – 825, Jan. 2008.

JAMES, C.; UGO, V.; COUÉDIC, J.P. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature*, London: v. 434 (7037), p. 1144 – 8, Apr. 2005.

JAMIESON, C.H.M.; GOTLIB, J.; DUROCHER, J.A. et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in Polycythemia vera e predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington: v. 103, n. 16, p. 6224 – 9, Apr. 2006.

JIN, Z., EI-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. Georgetown: v. 4, n.2, p. 139 – 63, Feb. 2005.

KALOUSEK, I.; BRODSKA, B.; OTEVRELOVA, P.; RÖSELOVA, P. Actinomycin D upregulates proapoptotic protein Puma and downregulates Bcl-2 mRNA in normal peripheral blood lymphocytes. *Anticancer Drugs*, Oxford : v. 18, n. 7, p. 763 – 72, Aug. 2007.

KELLEY, K.W.; MEIER, W.A.; MINSHALL, C. et al. Insulin growth factor-I inhibit apoptosis in hematopoietic progenitor cells: implications in thymic aging. *Ann N Y Acad Sci*, New York: v. 840, p. 518 – 24, May 1998.

KITADA, S.; REED, J. C.; MCL-1 Promoter Insertions Dial-Up Aggressiveness of Chronic Leukemia. *J Natl Cancer Inst*, Bethesda, v. 96, n. 9, p. 642 – 3, May 2004.

KRALOVICS, R.; PASSAMONTI, F.; BUSER, A. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, Boston: v. 352, n. 17, p. 1779 – 90, Apr. 2005.

KRALOVICS, R.; BUSER, A. S.; TEO, S.S. et al. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, New York: v. 102, p. 1869 – 1871, Sep. 2003.

LEE, H. W.; LEE, S. S.; LEE, S. J.; UM, H. D. Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-

activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Cancer Res*, Chicago: 63, p. 1093 – 1100, Mar. 2003.

LEVINE, R.L.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A.; GILLILAND, D.G. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*, London: v. 7, p. 673 – 83, Sep 2007.

LEVINE, R.L.; WADLEIGH, M.; COOLS, J.; et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, Cambridge: v. 07, n. 04, p. 387 – 97, Apr.2005.

LEVINE, R. L.; WERNIG, G. Role of JAK-STAT Signaling in the Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders; *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, Washington; p.233 – 9, Dec. 2006.

LU, X.; LEVINE, R.; TONG, W. et al. Expression of a homodimeric type 1 cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington: v. 102, n. 52, p. 18962 – 7, Dec. 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*, New York, v. 89, p. 1862-69, Mar. 1997.

MOLITERNO, A.R.; HANKIS, D.; SPIVAK, J.L. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*, Boston: v. 338, n. 09, p. 572 – 80, Feb. 1998.

NI, R.; TOMITA, Y.; MATSUDA, K.; et al. Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp Cell Res*, New York: v. 215, n. 2, p. 332 – 7, Dec. 1994.

NUSSENZVEIG, R.H.; SWIERCZEK, S.I.; JELINEK, J.; et al. Polycythemia vera is not initiated by JAK2 V617F mutation. *Exp Hematol*, Copenhagen: v. 35, p. 32 – 38, Jan. 2007.

ODA, A; SAWADA, K.; DRUKER, B.J. et al. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of JAK2, STAT5a and STAT5b in primary cultured human erythroid precursors. *Blood*, Manchester, v. 92, p. 443 – 51, July 1998.

PANANI, A. D. Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: Clinical implications. *Cancer lett*, Amsterdam; v.255, n. 1, p. 12 – 25, Sep. 2007.

PARKER, J.E.; MUFTI, G.J.; RASOOL, F.; MIJOVIC, A.; DEVEREUX, S.; PAGLIUCA, A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*, New York: v. 96, n. 12 p. 3932 – 8, Dec. 2000.

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

PERRY, R.P.; KELLEY, D.E. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol*, Philadelphia: v. 76, n. 2, p. 127 – 39, Oct. 1970.

PRCHAL, J.T. Polycythemia vera and other primary polycythemias. *Curr Opin Hematol*, Cambridge: v. 12, n. 02, p. 112 – 6, Mar. 2005.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, London: v. 1, n.3, p. 1458 – 61, Aug. 2006

SAFA, A. R.; DAY, T. W.; WU, C. H. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, Hilversum: v. 8, n. 1, p. 37 – 46; Feb. 2008.

SANLIOGLU, A. D.; KORCUM, A. F.; PESTERELI, E.; et al. TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, Elmsford; v. 69, n. 3, p. 716 – 23, Mar. 2007.

SCHIMMER, A. D. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Res*, Chicago: v. 64, p. 7183–7190, Oct. 2004.

SCOTT, L.M.; TONG, W.; LEVINE, R.L.; SCOTT, M.A.; BEER, P.A.; STRATTON, M.R., et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, Boston: v. 356, n. 5, p. 444 – 5, Feb. 2007

SEGURA, M.F.; SOLE, C.; PASCUAL, M.; et al. The Long Form of Fas Apoptotic Inhibitory Molecule Is Expressed Specifically in Neurons and Protects Them against Death Receptor-Triggered Apoptosis. *J. Neurosci*, Baltimore: v. 27, n. 42, p. 11228 – 41, Oct. 2007.

SHARMA, K.; WANG, R.X.; ZHANG, L.Y. et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther*, Oxford: v.88, n.3, p.333 – 47, Dec. 2000.

SHARPE, J.C.; ARNOULT, D.; YOULE, R.J. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam: v. 1644, n. 2-3, p. 107 – 13, Mar. 2004.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, Cambridge: v.9, n.3, p.459 – 70, Mar. 2002.

SILVER, R.T.; BENNETT, J.M.; GOLDMAN, J.M.; SPIVAK, J.L.; TEFFERI, A. The Third International Congress on Myeloproliferative and Myelodysplastic Syndromes. *Leuk Res*, Oxford: v. 31, p. 11 – 7, Jan. 2007.

SILVA, M.; RICHARD, C.; BENITO, A.; et al. Expression of *bcl-x* in erythroid precursors from patient with polycythemia vera. *N Engl J Med*, Boston: v. 338, n. 09, p. 564 – 71, Feb. 1998.

SIMMONS, M. J.; FAN, G.; ZONG, W. X.; DEGENHARDT, K.; WHITE, E.; GELINAS, C. Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene*, Basingstoke: v.27, p.1421 – 28, Feb. 2008.

SIMPSON, L.A.; BURWELL, E.A.; THOMPSON, K.A.; SHAHNAZ, S.; CHEN, A.R.; LOEB, D.M. The antiapoptotic gene A1/BFL1 is a WT1 target gene that mediates granulocytic differentiation and resistance to chemotherapy. *Blood*, New York: v. 107, n. 12, p. 4695 – 702, Jun 2006.

SPIVAK, J.L. Polycythemia vera: myths, mechanisms and management. *Blood*, New York: v. 100, n. 13, p. 4272 – 90, Dec. 2002.

SPIVAK, J.L. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin Hematol*, New York: v. 41, n.2 (suppl 3), p. 1 – 5, Apr. 2004.

SPIVAK, J.L.; BAROSI, G.; TOGNONI, G.; et al. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, Washington: p.200 – 24, Dec. 2003

SOCOLOVSKY, M.; FALLON, A.E.; WANG, S.; BRUGNARA, C.; LODISH, H.F.; Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in STAT5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for STAT5 in *bcl-x_L* induction. *Cell*, Boston: v. 98, p. 181-91, July 1999.

SOLE, C.; DOLCET, X.; SEGURA, M. F.; et al. The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF- κ B signaling. *J Cell Biol*, New York; v. 167, n. 3, p. 479 – 492, Nov. 2004.

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

TEMERINAC, S.; KLIPPEL, S.; STRUNCK, E. et al. Cloning of PRV-1 a novel member of the uPAR receptor superfamily, with is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood*, New York: v. 95, n. 08, p. 2569 – 76, Apr. 2000.

TESTA, U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*, London: v.18, p. 1176 – 1199, Jul. 2004.

THOMADAKI, H.; SCORILAS, A.; Bcl2 Family of Apoptosis-Related Genes: Functions and Clinical Implications in Cancer; *Crit Rev Clin Lab Sci*, Boca Raton, v.43, n.1, p.1–67; Jan. 2006.

TROEGER, A.; SCHMITZ, I.; SIEPERMANN, M.; et al. Upregulation of c-FLIP_{S+R} upon CD40 stimulation is associated with inhibition of CD95⁻ induced apoptosis in primary precursor B-ALL. *Blood*, New York: v. 110, n. 1, p. 384 – 7, Jul. 2007.

UGO, U.; MARZAC, C.; TEYSSANDIER, I.; et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*, Copenhagen: v. 32, p. 179 – 87, 2004.

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*: Austria: v. 1, n. 1, p. 239 – 46, Jun. 2007.

VAN ETTEN, R.A.; SHANNON, K.M. Focus on myeloproliferative diseases and myelodysplastic syndromes. *Cancer Cell*, Cambridge: v. 06, p. 547 – 52, Dec. 2004.

VANNUCCHI, A. M.; ANTONIOLI, E.; GUGLIELMELLI, P.; et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2 (V617F) allele burden. *Leukemia*. London; v. 21, n. 9, p. 1952 – 9, Sep. 2007.

VANNUCCHI, A.M.; GUGLIELMELLI, P., ANTONIOLI, E.; et al. Inconsistencies in the association between the JAK2(V617F) mutation and PRV-1 over-expression among the chronic myeloproliferative diseases. *Br J Haematol*. Oxford : v. 132, n. 5, p. 652 – 4, Mar 2006.

VARDIMAN, J.W.; HARRIS, N.L.; BRUNNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm. *Blood*, New York: v. 100, n. 7, p. 2292 – 302, Oct. 2002.

VON REYHER, U.; STRÄTER, J.; KITTSTEIN, W.; GSCHWENDT, M.; KRAMMER, P.H.; MÖLLER, P. Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res*. Chicago: v. 58, n. 3: p. 526 – 34, Feb. 1998.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, Cold Spring Harbor: v. 15, p. 2922 – 33, Nov. 2001.

WANG MJ, LIU S, LIU Y, ZHENG D. Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurisci Res Shannon*: v. 59, n. 1, p. 40 – 6, Sep. 2007.

WAJANT, H.; HAAS, E.; SCHWENZER, R.; MUHLENBECK, F.; KREUZ, S.; SCHUBERT, G.; et al. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem*, São Francisco: v. 275, p. 24357 – 66, Aug. 2000.

WERNIG G, MERCHER T, OKABE R, LEVINE RL, LEE BH, GILLILAND DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood*, New York: v. 107, p. 4274 – 81, Jun. 2006.

WITTHUHN, B.A.; QUELLE, F.W.; SILVENNOINEN, O. et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, Boston: v. 74, n. 02, p. 227 – 36, Jul. 1993.

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

WUILLÈME-TOUMI S, TRICHET V, GOMEZ-BOUGIE P, GRATAS C, BATAILLE R, AMIOT M. Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. New York: v. 361, n. 4, p. 865 – 9. Oct. 2007.

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

ZHANG Y, FOU DI A, GEAY JF, et al. Intracellular localization and constitutive endocytosis of CXCR4 in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, Basel; v.22, n. 6, p. 1015 – 29. Nov. 2004.

ZEYTUN, A.; HASSUNCH, M.; NAGARKATTI, M.; NAGAKARTTI, P. Fas-Fas ligand-based interactions between tumor cells and tumor specific cytotoxic T lymphocytes: a lethal two-way street. *Blood*, New York: v. 90, p. 1952 – 9, Sep. 1997.

ZEUNER, A.; PEDINI, F.; SIGNORE, M. et al. Increased death receptor resistance and FLIP_{short} expression in Polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood*, New York: v. 107, n.01, p. 3495 – 502, May 2006.

ZINKEL, S.;GROSS, A.; YANG, E.; Bcl2 Family in DNA Damage and Cell Cycle Control; *Cell Death Differ*, London: v.13, p.1351–1359; Aug. 2006.