

## **Expressão dos transcritos de APAF-1 em células de medula óssea de pacientes com síndromes mielodisplásicas: correlação com progressão da doença**

### **RESUMO**

Apoptose tem papel crucial na fisiopatologia das síndromes mielodisplásicas (SMD). Nas fases iniciais, há aumento excessivo nas taxas de apoptose, que diminuem com a progressão da doença e sua transformação em leucemia mielóide aguda. A via do citocromo-c/APAF-1/caspase-9 é um dos mecanismos descritos para apoptose nas células mielodisplásicas. Foram descritas 4 isoformas de APAF-1 geradas através de clivagem alternativa. As isoformas APAF-1XL e APAF-1LN contêm uma inserção de 11 aminoácidos entre os domínios CARD e ATPásico na região NH<sub>2</sub>-terminal, e APAF-1XL apresenta também uma repetição WD-40 adicional na região COOH-terminal, que foi descrita como essencial para conversão de pro-caspase 9 em sua forma ativa. Neste trabalho, a expressão dos diferentes transcritos de APAF-1 foi avaliada em células obtidas de 33 pacientes com SMD. *APAF-1XL* e *APAF-1LN* mostraram expressão significativamente maior em doença de baixo risco quando comparada com alto risco, de acordo com as classificações IPSS ( $p=0.0004$  e  $p=0.0255$ , respectivamente). *APAF-1XL* e *APAF-1LN* mostraram também marcante aumento de expressão durante a diferenciação eritróide de células CD34<sup>+</sup> de paciente com SMD de baixo risco (26 vezes e 12 vezes, respectivamente, comparando o 14<sup>o</sup> com o 6<sup>o</sup> dia de cultura), coincidindo com aumento nos níveis de apoptose observados nessas células no mesmo período. Os resultados inéditos aqui obtidos, mostrando alta expressão dos transcritos de APAF-1 em células de pacientes com SMD de baixo risco, sugerem que APAF-1 exerça papel importante na desregulação da apoptose que acompanha a progressão da doença.

## **1. Introdução**

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoiéticas clonais, onde o clone anômalo é caracterizado por displasia morfológica e diferenciação deficiente, resultando em células não funcionais. As conseqüências desta hematopoiese deficiente são citopenias no sangue periférico, que podem envolver os três segmentos do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A anemia e seus sintomas relacionados são as manifestações clínicas mais comuns da maioria das SMDs [1, 2]

As mielodisplasias foram classificadas em 1982 pelo grupo cooperativo franco-americano-inglês (FAB) nas seguintes categorias: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em forma de anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt), e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), apresentando dentre estas classes um aumento progressivo no número de precursores imaturos na medula (de 5% até 30% de blastos). Esta classificação foi amplamente aceita e sua relevância clínica tem sido demonstrada em numerosos estudos. Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma nova classificação, com modificações que melhoram o valor prognóstico da classificação, como diminuição do número de blastos na medula óssea para definir leucemia mielóide aguda (de 30 para 20%) e a inclusão do estudo do cariótipo. Deste modo, as mielodisplasias são classificadas, segundo a OMS, nas seguintes categorias: anemia refratária (AR), anemia refratária com blastos em forma de anel (ARSA), citopenia refratária com displasias múltiplas (CRDM), citopenia refratária com displasias múltiplas e blastos em forma de anel (CRDM-SA), anemia refratária com excesso de blastos-1 e 2 (AREB-1 e AREB-2), síndrome mielodisplásica não classificada (SMD-N) e SMD associada com a deleção no

cromossomo 5q (5q). Além dessas classificações, foi desenvolvido também o Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica (IPSS) nas SMDs, derivado da análise de mais que 800 casos, que resultou em valores que oscilam de 0 a >2,5 e predizem com certa precisão a sobrevida e risco de evolução para LMA [2]

Pouco se sabe a respeito da patogênese das SMDs e dos processos que medeiam a sua freqüente transformação em leucemias. A excessiva apoptose intramedular é um dos mecanismos implicados na hematopoiese ineficaz observada nesse grupo de doenças [3, 4]. De acordo com estudos prévios, o aumento nas taxas de morte celular é mais pronunciado nos estágios iniciais da doença do que nos estágios mais avançados, e a progressão para leucemia mielóide aguda é acompanhada por redução na apoptose e bloqueio na diferenciação mielóide [1, 5]. As vias de sinalização celular que desencadeiam a apoptose nas SMD, entretanto, permanecem apenas parcialmente elucidadas. Um mecanismo descrito para a apoptose da série eritróide nas SMD envolve a via apoptótica dependente da mitocôndria. A ativação de receptores de morte celular ou a direta ativação da mitocôndria resulta na liberação do citocromo-c dessas organelas e posterior ativação da caspase-9 através da atuação de APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1) [6, 7].

APAF-1 é um componente central na via intrínseca da apoptose e a desregulação da função dessa proteína resulta no desenvolvimento de diversos processos neoplásicos em humanos e resistência a quimioterapia. [8]. A deficiência de APAF-1 constitui um modo de resistência a apoptose em células leucêmicas [9] e pior prognóstico foi observado em pacientes com perda da expressão de APAF-1 concomitante com mutação de p53 em leucemia linfóide crônica [10].

A APAF-1 originalmente descrita foi identificada como homóloga ao CED-4 de *C. elegans*. Essa proteína de 130kD é composta de três domínios funcionais: CARD (caspase

recruitment domain) no N-terminal seguido de um domínio ATPásico e um domínio na região C-terminal composto por 12 repetições WD-40 (WDR). [11]. Clivagem alternativa do gene pode gerar uma inserção de 11 aminoácidos na região N-terminal entre os domínios CARD e ATPásico ou uma repetição WD adicional entre a quinta e sexta WDR. O cDNA de APAF-1 denominado *APAF-IXL* contém a inserção de 11 aminoácidos na região NH2-terminal e a repetição WD adicional. As outras isoformas descritas contêm apenas a inserção na região NH2 (chamada *APAF-ILN*) ou a inserção da WDR adicional (*APAF-ILC*) [11, 12]. A repetição WD-40 adicional foi descrita como essencial para que se efetue a ativação da procaspase-9 [13]. Entretanto, o padrão de expressão das diferentes isoformas de APAF-1 ainda não foi devidamente investigado em neoplasias hematológicas.

Reconhecendo a importante atuação de APAF-1 na maquinaria apoptótica e seu papel nas neoplasias humanas, levantamos a hipótese de que diferentes níveis de APAF-1 poderiam estar correlacionados com a progressão da SMD e sua transformação em LMA através da sinalização apoptótica. Em vista da ausência de dados na literatura, o objetivo deste estudo foi caracterizar os níveis de expressão do RNAm dos diferentes transcritos de APAF-1 em SMD de alto e baixo risco. Para investigar a possível modulação da expressão dos transcritos de APAF-1 com os elevados níveis de apoptose nos progenitores da medula óssea, também objetivamos verificar a expressão dos transcritos de APAF-1 e as taxas de apoptose ao longo da diferenciação de células CD34+ provenientes da medula óssea de um paciente com mielodisplasia e um doador de medula óssea normal.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Amostras de medula óssea*

Aspirados de medula óssea foram obtidos de 33 pacientes com diagnóstico de SMD e um doador de medula óssea normal. Dados clínicos dos pacientes e sua distribuição de acordo com as classificações da doença podem ser vistos na Tabela 1. Todos os pacientes e o doador normal deram seu consentimento informado por escrito e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital.

## *2.2 Cultura de células*

Para os ensaios de diferenciação eritróide, amostras de medula óssea foram coletadas de um paciente com mielodisplasia de baixo risco (IPSS: baixo; FAB: AR; OMS: AR) e um doador normal. Células mononucleares foram isoladas em gradiente de Ficoll-Hypaque e os progenitores CD34<sup>+</sup> separados por colunas de imunoafinidade MIDI-MACS. Foram então colocadas em placas de cultura em meio de metilcelulose contendo eritropoetina (EPO) (3 IU/mL) e Interleucina 3 (30 IU/mL) e foram incubadas a 37° C por 6 dias. As colônias resultantes (BFU-E, CFU-E e pro-eritroblastos) foram cultivadas por mais 8 dias em meio alphaMEM com mercaptoetanol, eritropoetina, holotransferrina e albumina de soro bovino. No 6<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias, as células foram coletadas e submetidas a RT-PCR em tempo real e imunofenotipagem.

## *2.3 Imunofenotipagem*

Apoptose das células foi quantificada por marcação dupla com anexina V e iodeto de propídeo de acordo com instruções dos fabricantes, e analisadas por citometria de fluxo. Para investigação da maturação eritróide, a expressão de marcadores da superfície celular foi avaliada por dupla marcação com receptor anti-transferrina (CD71) e anti-glicoporina A (GPA).

#### 2.4. Transcrição reversa

RNA foi extraído das células utilizando o reagente Trizol®. Um micrograma de RNA foi então tratado com 1 U de DNaseI para posterior transcrição reversa com SuperScriptII® (Life Technologies). As amostras de cDNA foram quantificadas utilizando-se o espectrofotômetro Gene Quant UV (Pharmacia).

#### 2.5. RT-PCR semi-quantitativo

RNA transcrito foi submetido a RT-PCR semi-quantitativo em reações de 50-µL em uma mistura contendo a polimerase *high fidelity* Taq Platinum® (Invitrogen). As quantidades relativas de cDNA de *APAF-1* contendo ou não a inserção dos 11 aminoácidos na região NH2-terminal foram determinados utilizando-se os seguintes iniciadores: N1, 5'-GTAAGAAATGAGCCCACTC-3' e N2, 5'-TACTCCACCTTCACACAG-3', e as seguintes condições de PCR: 33 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 40 segundos de anelamento a 52°C e 30 segundos de extensão a 72°C, seguidos de 5 min de extensão a 72°C. As quantidades relativas de cDNA de *APAF-1* com ou sem a repetição WD adicional na região COOH-terminal foram determinadas através dos seguintes iniciadores: C1, 5'-CAGCTGATGGAACCTTAAAGC-3' e C2, 5'-GTCTGGTCATCAGAAGATGTC-3' [12], e as seguintes condições de PCR: 33 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 50 segundos de anelamento a 58°C e 50 segundos de extensão a 72°C, seguidos por 5 minutos de extensão a 72°C. Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose a 1.5% e analisados por coloração com brometo de etídio no programa Kodak Digital Image 1D 3.0.2.

## 2.6. RT-PCR quantitativo em tempo real

Detecção da amplificação em tempo real foi realizada pela máquina ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) com o reagente SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Quinze ng de cada amostra de cDNA foi utilizado para cada reação contendo os seguintes iniciadores (1) 150nM de *β-actina* (Fw: 5'-CCC AGC ACA ATG AAG ATC AAG ATC AT-3'; Rv: 5'-ATC TGC TGG AAG GTG GAC AGC GA-3'); (2) 150nM de *GAPDH* (Fw: 5'-GCA GCA ATC CAA AAG AGT CTC A-3'; Rv: 5'-ATT TCC AAG AAT TTT CAG ATC AGG A-3'); (3) 150nM de iniciadores para *APAF-IXL* (Fw: 5'-GTC TGC TGA TGG TGC AAG GA -3'; Rv: 5'-GAT GGC CCG TGT GGA TTT C-3') e (4) 150nM de iniciadores para *APAF-ILN* (Fw: 5'-GGA TAA TGG TGG CAG CAA AAA A-3'; Rv: 5'-CAC ACC ATG AAC CCA ACT TAA ATG-3'). Expressão de *β-actina* e *GAPDH* foi usada como controle endógeno e uma amostra de linhagem celular K562 foi usada como amostra calibradora. O valor relativo da quantificação da expressão gênica de *APAF-IXL* e *APAF-ILN* foi calculado com a equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [6]. Um controle negativo foi também incluído para cada par de iniciadores, e as reações foram realizadas em duplicata na mesma placa para cada amostra.

## 2.7. Análise estatística

Os níveis de expressão de *APAF-IXL* e *APAF-ILN* foram comparados entre baixo risco/intermediário-1 e intermediário-2/alto risco (IPSS), AR/ARSA e AREB/AREBt (FAB) e AR/CDRM/CDRMSA e AREB1/AREB2 (OMS), utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Um p-valor menor que 0.05 foi considerado como de significância estatística.

**Tabela1.** Características dos pacientes

	Número de pacientes
Pacientes estudados	33
Gênero	
Masculino/Feminino	16/17
Idade (mediana e variação)	68 (38-91)
FAB	
AR/ARSA	13/8
AREB/AREBt	8/4
IPSS	
Baixo risco/ Intermediário-1	16/9
Intermediário-2/ Alto Risco	4/4
OMS	
AR/RCMD/ RCMD-RS	4/9/8
AREB1/ AREB2	3/5
LMA com displasia trilinear	4

AR:Anemia Refratária, ARSA: Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel, AREB: Anemia Refratária com Excesso de Blasros, AREBt: Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação, CRDM: Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem, CRDM-AS: Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem com Sideroblastos em

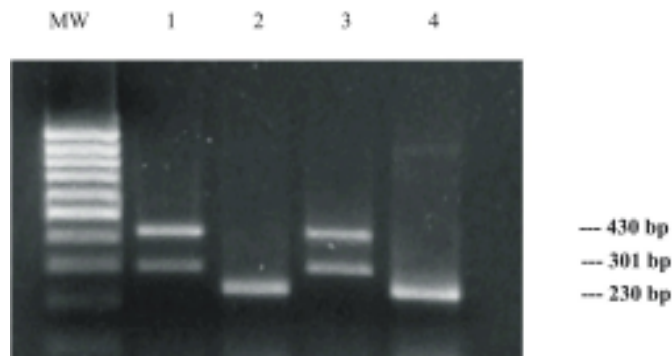
Anel, AREB1: Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1, AREB2: Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2.

### **3. Resultados**

#### *3.1 Expressão dos diferentes transcritos de APAF-1 em pacientes com mielodisplasia através de RT-PCR*

Trinta e três amostras de medula óssea obtidas de pacientes com SMD foram submetidas a RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a inserção dos 11 aminoácidos na região NH<sub>2</sub> terminal (iniciadores N1 e N2) e para a repetição WD adicional (iniciadores C1 e C2).

A análise por RT-PCR utilizando os iniciadores N1 e N2 revelou, em todas as amostras, apenas transcritos contendo a inserção dos 11 aminoácidos. Os experimentos com os iniciadores C1 e C2 demonstraram em todas as amostras dois produtos, embora a quantidade relativa de cada um parecesse variar entre as amostras (Fig.1). Concluindo, levando em consideração ambas as análises por PCR, apenas os transcritos *APAF-IXL* e *APAF-ILN* estão presentes nas células mielodisplásicas.



**Figura 1.** RT-PCR semi-quantitativo dos transcritos de APAF-1 em amostras de 2 pacientes com SMD. A amplificação da inserção dos 11 aminoácidos na região NH<sub>2</sub>-terminal foi detectada em todas as amostras (como mostrado nas colunas 2 e 4- 230pares de bases).Análise por PCR usando os iniciadores C1 e C2 (colunas 1 e 3) evidenciaram, em todas as amostras, dois produtos (com e sem a amplificação da repetição WD adicional- 430 e 301 pares de base, respectivamente) embora a expressão relativa de cada um deles pareça variar entre as amostras, de acordo com a intensidade do brilho das bandas. MW= marcador 100pb.

### 3.2. Expressão relativa de *APAF-1XL* e *APAF-1LN* em pacientes com SMD através de RT-PCR em tempo real

Com a intenção de caracterizar os níveis de expressão de *APAF-1XL* e *APAF-1LN* em amostras de SMD, foram realizadas reações de RT-PCR em tempo real. De acordo com o IPSS, a análise por PCR em tempo real demonstrou expressão significativamente maior de *APAF-1XL* em medula óssea de pacientes com baixo risco (baixo/intermediário-1) quando comparados com SMD de alto risco (intermediário-2/alto). (18.316 [3.095–

169.48] *versus* 3.632 [2.412–8.112];  $P = 0.0004$ ) (Figura 2A). Pacientes com doença de baixo risco também apresentaram maiores níveis de *APAF-ILN* do que os de alto risco (11.472 [0.9862–99.388] *versus* 4.925 [0.7245–15.562];  $P = 0.0255$ ) (Figura 3A). Portanto, de acordo com IPSS, SMD de baixo risco é associada a níveis maiores de expressão de *APAF-IXL* e *APAF-ILN*, particularmente do transcrito *APAF-IXL*.

Baseando-se na classificação FAB, a expressão do RNAm de *APAF-1XL* esteve significativamente aumentada no grupo AR/ARSA comparada com o grupo AREB/AREBt, (14.684 [3.095–169.48] *versus* 4.516 [2.412–69.310];  $P = 0.0295$ ). A expressão de *APAF-ILN* foi similar nos dois grupos (Fig.3B).

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), não houve diferença significativa da expressão de *APAF-IXL* e *APAF-ILN* nos grupos de pacientes classificados como AR/RCMD/RCMDRS ou AREB1/AREB2 (Fig.2C e 3C).

### 3.2 Expressão do RNAm de *APAF-IXL* e *APAF-ILN* durante a diferenciação eritróide

Sabe-se que as taxas de apoptose aumentam conforme as células mielodisplásicas se diferenciam, permanecendo baixas em células normais sob as mesmas condições.[14]. Na tentativa de avaliar se a expressão de *APAF-IXL* e *APAF-ILN* é modulada pelo aumento da apoptose em células mielodisplásicas, células CD34+ obtidas de um doador de medula óssea normal e um paciente com SMD de baixo risco (AR) foram submetidas a ensaio de diferenciação eritróide e os níveis dos transcritos de *APAF-1* foram avaliados nos dias 6 e

14 da diferenciação celular. Simultaneamente, foi quantificado o número de células em apoptose também nesses mesmos dias.

As células em diferenciação terminal foram positivas para transferrina e glicoforina A na citometria de fluxo. Na cultura do paciente normal e com SMD, elas representavam 51.96% e 88.3% das células no dia 6, e 95.06% e 94.17% no dia 14, respectivamente. A cultura de células normais conteve 5.63% de células em apoptose (anexina V-positiva e PI-negativo) no dia 6 e 2,5% no dia 14, enquanto a cultura de SMD conteve 4,78% de células em apoptose no dia 6 e 9,5% no dia 14 (Fig.4).

Os níveis dos transcritos de *APAF-1* foram também avaliados em ambas as culturas nos dias 6 e 14. Na cultura de células normais, a expressão tanto de *APAF-IXL* quanto *APAF-ILN* foi 3 vezes maior no dia 14 do que no dia 6. Quanto às células CD34+ do paciente com mielodisplasia, o aumento na expressão de *APAF-IXL* e *APAF-ILN* foi consideravelmente maior (26 vezes e 12 vezes maior no 14º dia comparado com o 6º, respectivamente. (Figure 4). Esses resultados evidenciam que o aumento na expressão de *APAF-IXL* e *APAF-ILN*, especialmente *APAF-IXL*, coincide com as maiores taxas de apoptose nas células mielodisplásicas em diferenciação eritróide terminal, já que as células CD34+ de SMD apresentaram 4,5% de apoptose no 6º dia de cultura, e 9,5% de células em apoptose no 14º dia.

#### **4. Discussão e conclusão**

Os resultados aqui apresentados demonstraram que células de pacientes com SMD expressam *APAF-IXL* e *APAF-ILN*, mas não *APAF-ILC*. De acordo com a classificação IPSS, níveis maiores de expressão de *APAF-IXL* e *APAF-ILN* foram observados em SMD

de baixo risco comparado com doença de alto risco. De acordo com FAB, na doença de baixo risco foram observados níveis significativamente maiores de *APAF-IXL*, mas não de *APAF-ILN*. Células mielodisplásicas da série eritróide apresentaram também taxas maiores de apoptose comparadas com células normais, acompanhadas de expressão aumentada de *APAF-IXL* e *APAF-ILN*.

Diversos estudos demonstraram que APAF-1 é uma proteína pró-apoptótica que se encontra menos expressa em células leucêmicas. [9]. Pacientes com leucemia linfóide crônica com perda da expressão de APAF-1 e mutações de p53 apresentaram pior prognóstico [10], e silenciamento genético de APAF-1 também foi descrito em blastos de leucemia mielóide aguda [15]. Além disso, os níveis intracelulares de APAF-1 mostraram-se determinantes para ocorrência de apoptose induzida por etoposídeo e paclitaxel em células HL-60 [16]. Entretanto, estes estudos não descreveram a expressão ou função específica de cada uma das isoformas dessa proteína nesses eventos. Benedict e colaboradores [13] foram os pioneiros a estudar as isoformas de APAF-1 e seu papel em células normais e tumorais. Identificaram que, no nível de expressão do RNAm, *APAF-IXL* é o RNA mais expresso em todos os tecidos normais estudados, enquanto *APAF-ILN* foi expressa em alguns tecidos normais, incluindo medula óssea.

Neste trabalho, mostramos pela primeira vez que *APAF-IXL* e *APAF-ILN* são os transcritos encontrados em células mielodisplásicas. Também foi possível notar que os transcritos de APAF-1 estão diferentemente expressos de acordo com o risco alto ou baixo na SMD (IPSS). Pacientes classificados como baixo risco de acordo com IPSS apresentaram maiores níveis de *APAF-IXL* ( $p=0.0004$ ) e *APAF-ILN* ( $p=0.02$ ) comparados àqueles com doença de alto risco. É importante notar que houve maior significância estatística para *APAF-IXL*. Em relação à classificação FAB, houve aumento significativo

apenas de *APAF-1XL* na doença de baixo risco ( $p=0.02$ ), sendo que os níveis de *APAF-1LN* permaneceram iguais em ambos os grupos. Esses resultados podem indicar que *APAF-1XL* desempenhe um papel de maior importância na progressão da doença. Nenhuma diferença estatística foi observada quando os pacientes foram classificados de acordo com a OMS. Isso pode ser explicado pelo fato de 4 pacientes terem sido excluídos da análise, já que foram classificados como LMA de acordo com os parâmetros da OMS. Esses pacientes apresentaram níveis baixos de expressão de *APAF-1*, e isso possivelmente influenciou no cálculo estatístico.

Estudos têm mostrado de forma consistente que a apoptose está desregulada em SMD e LMA. Dados de diversos estudos sugerem que nos estágios mais iniciais da doença, o aumento na apoptose está associado a menor sobrevivência das células hematopoiéticas, enquanto em fases mais tardias, a progressão de SMD para LMA ocorre concomitantemente com decréscimo da apoptose e aumento na sobrevivência das células, levando à subsequente expansão das células precursoras anômalas [17, 18]. Portanto, de acordo com essas evidências, podemos inferir que é esperado um aumento na expressão de *APAF-1* nos grupos de SMD com maiores taxas de apoptose.

Apesar dessas evidências, os mecanismos patogênicos envolvidos na progressão das síndromes mielodisplásicas e na sua transformação em leucemia aguda estão apenas parcialmente elucidados. Nas SMD a apoptose parece ser mediada em grande parte pela ativação da via do Fas. Ligação de TRAIL e FAS-L aos seus respectivos receptores ativa via de sinalização de morte intracelular que resulta na ativação da caspase-8. [14]. Desregulação significativa na expressão de Fas e Fas-L na medula óssea de pacientes com SMD, incluindo sua relação com progressão da doença, foram mostrados previamente [19, 20]. Entretanto, evidências recentes têm demarcado a importância do eixo mitocondrial da

apoptose nas células mielodisplásicas. Eritroblastos de pacientes com AR e ARSA mostram liberação constitucional de citocromo-c da mitocôndria [21] e em ARSA associada a deleção congênita do braço curto do cromossomo 4, a hematopoiese ineficaz foi explicada por aumento da apoptose associada a hiperativação da maquinaria apoptótica dependente da mitocôndria, a não da via do Fas [22]

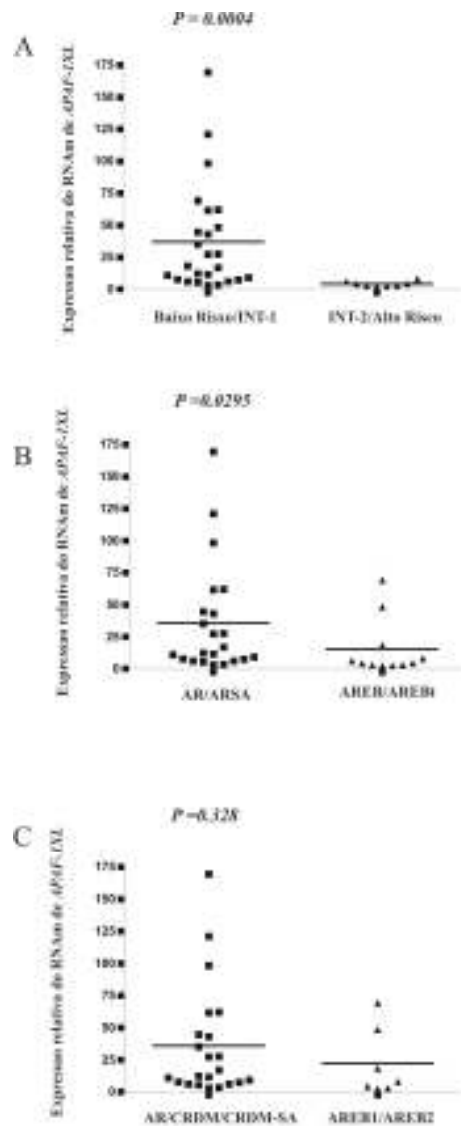
É interessante salientar que ensaios in vitro de ativação das caspases, realizados por Benedict e colaboradores [13] em células normais e neoplásicas, demonstraram que a repetição WD extra, presente em algumas moléculas de APAF-1, é essencial para que ocorra a conversão de pro-caspase 9 em sua forma ativa. A presença dessa repetição adicional na estrutura da proteína permite a formação de uma plataforma de interação com outras moléculas de forma mais estável. Isso é particularmente importante se considerarmos a formação do apoptossomo, em que múltiplas moléculas precisam ligar-se entre si (citocromo-c, ATP/dATP, procaspase-9 e oligômeros de APAF-1). [13].

A modulação da expressão de APAF-1 foi observada acompanhando o aumento na apoptose ocorrido nos experimentos com células CD34+ submetidas a diferenciação. Células mielodisplásicas em diferenciação apresentaram maiores taxas de apoptose comparadas às células normais, acompanhadas de aumento na expressão de *APAF-1XL* e *APAF-1LN*. Novamente, o incremento na expressão de *APAF-1XL* foi mais evidente do que o observado para *APAF-1LN*.

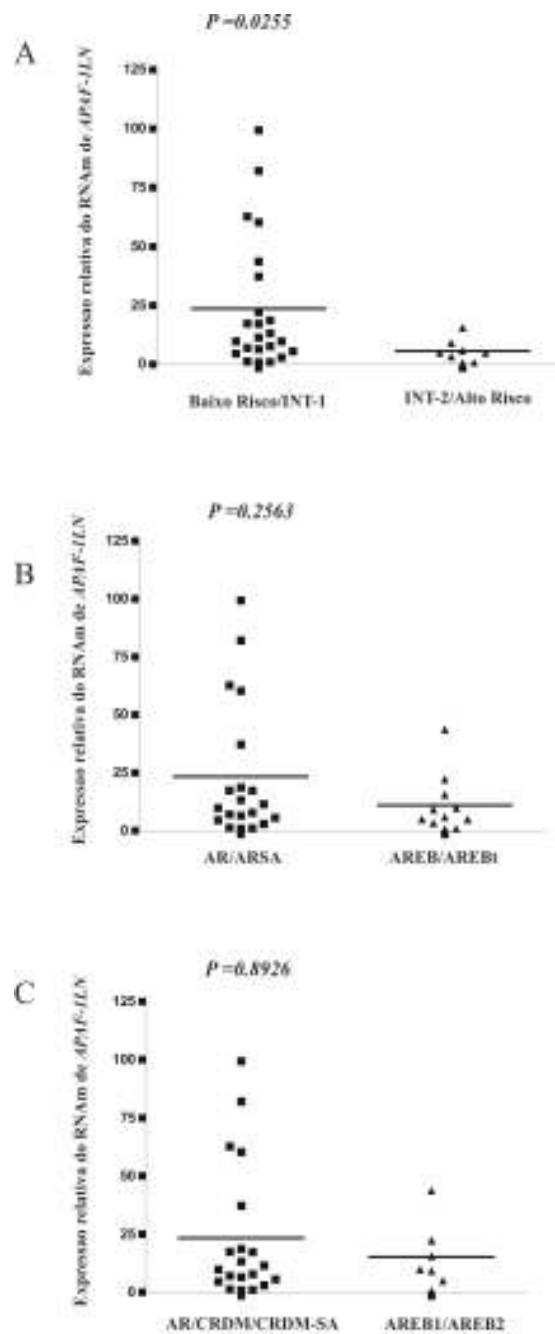
A maior expressão do RNAm de APAF-1XL em doença de baixo risco e sua correlação positiva com as taxas apoptóticas observadas durante a diferenciação eritróide de células de paciente com SMD podem indicar que a modulação de APAF-1 no nível de transcrição gênica participa na fisiopatologia das Síndromes Mielodisplásicas, aumentando a susceptibilidade das células à morte intramedular, um marco importante da doença. Além

disso, expressão reduzida dos transcritos de APAF-1 em SMD de alto risco pode indicar que APAF-1 está envolvida também na progressão da doença.

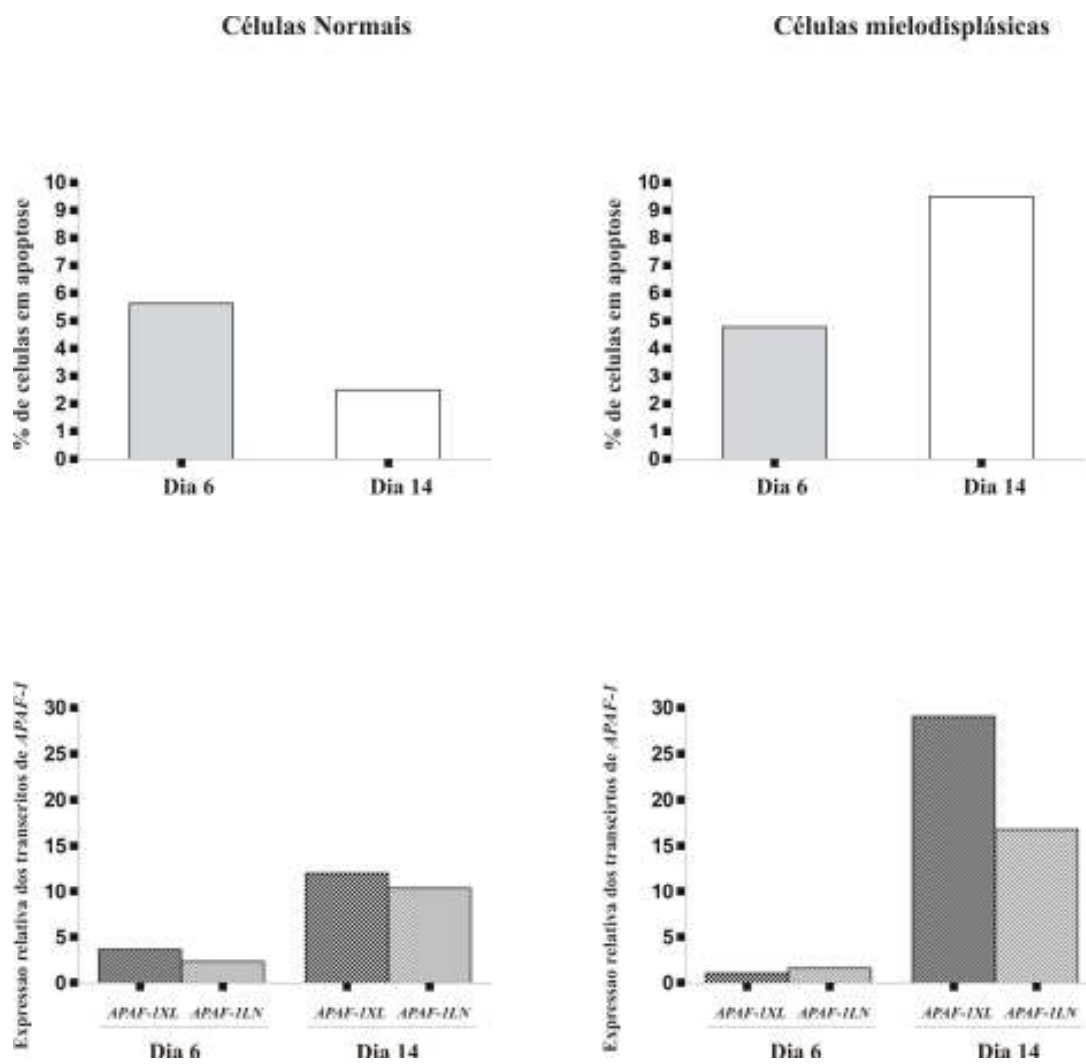
**Figura 2.** Expressão quantitativa de APAF-1XL em células de medula óssea de pacientes com Síndromes Mielodisplásicas, em relação a amostra calibradora, e de acordo com classificações da doença: IPSS (International Prognostic Score System) (A), Franco-Americana-Inglesa (B) e Organização Mundial de Saúde (C).



**Figura 3.** Expressão quantitativa de APAF-1LN em células de medula óssea de pacientes com Síndromes Mielodisplásicas, em relação a amostra calibradora, e de acordo com classificações da doença: IPSS (International Prognostic Score System) (A), Franco-Americana-Inglesa (B) e Organização Mundial de Saúde (C).



**Figura 4.** Análise da apoptose e expressão de APAF-1 em células CD34+ de doador normal e paciente com SMD nos dias 6 e 14 de diferenciação eritróide em cultura. Estão indicadas as porcentagens de células em apoptose (anexina V+/PI-) e expressão de *APAF-IXL* e *APAF-ILN* através de RT-PCR em tempo real, relativos a amostra calibradora.



## Referências

1. Mufti, G.J., *Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome*. Best Pract Res Clin Haematol, 2004. **17**(4): p. 543-57.
2. List, A.F., et al., *Myelodysplastic syndromes*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: p. 297-317.
3. Corey, S.J., et al., *Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 118-29.
4. Parker, J.E. and G.J. Mufti, *The role of apoptosis in the pathogenesis of the myelodysplastic syndromes*. Int J Hematol, 2001. **73**(4): p. 416-28.
5. Parker, J.E. and G.J. Mufti, *Excessive apoptosis in low risk myelodysplastic syndromes (MDS)*. Leuk Lymphoma, 2000. **40**(1-2): p. 1-24.
6. Tehrani, R., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors*. Blood, 2003. **101**(3): p. 1080-6.
7. Hellstrom-Lindberg, E., et al., *Apoptosis in refractory anaemia with ringed sideroblasts is initiated at the stem cell level and associated with increased activation of caspases*. Br J Haematol, 2001. **112**(3): p. 714-26.
8. Hajra, K.M. and J.R. Liu, *Apoptosome dysfunction in human cancer*. Apoptosis, 2004. **9**(6): p. 691-704.
9. Jia, L., et al., *Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells*. Blood, 2001. **98**(2): p. 414-21.
10. Sturm, I., et al., *Silencing of APAF-1 in B-CLL results in poor prognosis in the case of concomitant p53 mutation*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2329-36.
11. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
12. Hahn, C., et al., *Three new types of Apaf-1 in mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(3): p. 746-9.
13. Benedict, M.A., et al., *Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8461-8.
14. Claessens, Y.E., et al., *In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1594-601.
15. Furukawa, Y., et al., *Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukemia*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(6): p. 325-34.
16. Perkins, C., et al., *Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel- or etoposide-treated HL-60 cells*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4561-6.
17. Greenberg, P., et al., *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes*. Blood, 1997. **89**(6): p. 2079-88.
18. Rajapaksa, R., et al., *Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4275-87.
19. Gersuk, G.M., et al., *A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome*. Br J Haematol, 1998. **103**(1): p. 176-88.

20. Ribeiro, E., et al., *Flow cytometric analysis of the expression of Fas/Fasl in bone marrow CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(2): p. 309-13.
21. Tehranchi, R., et al., *Aberrant mitochondrial iron distribution and maturation arrest characterize early erythroid precursors in low-risk myelodysplastic syndromes*. Blood, 2005. **106**(1): p. 247-53.
22. Dror, Y., *The role of mitochondrial-mediated apoptosis in a myelodysplastic syndrome secondary to congenital deletion of the short arm of chromosome 4*. Exp Hematol, 2003. **31**(3): p. 211-7.