UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

BRUNA ALVES FENERICH

**Inibição farmacológica dos substratos do receptor de insulina em
neoplasia mieloproliferativa JAK2^{V617F}**

Ribeirão Preto
2017

BRUNA ALVES FENERICH

**Inibição farmacológica dos substratos do receptor de insulina em
neoplasia mieloproliferativa JAK2^{V617F}**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Área de Concentração: Clínica Médica -
Investigação Biomédica.

**Ribeirão Preto
2017**

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Fenerich, Bruna Alves

Inibição farmacológica dos substratos do receptor de insulina em neoplasia mieloproliferativa JAK2^{V617F} - Ribeirão Preto, 2017.

110 f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Clínica Médica - Investigação Biomédica. Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Orientadora: Traina, Fabíola

1. Neoplasia mieloproliferativa 2. JAK2V617F 3. NT157

4. Substratos do receptor de insulina

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP
(Bolsa de mestrado - FAPESP 2015/09324-9; agosto/2015 a abril/2017)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP
(Auxílio à Pesquisa - Regular - FAPESP 15/02200-2; abril/2016 a março/2018)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC)

Nome: FENERICH, Bruna Alves

Título: Inibição farmacológica dos substratos do receptor de insulina em neoplasia mieloproliferativa JAK2^{V617F}

*Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração:
Clínica Médica - Investigação Biomédica.*

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a todos aqueles
que estiveram ao meu lado durante esta
jornada, trazendo apoio e incentivo e
fazendo a caminhada mais leve.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por me fortalecer diariamente, guiando meus passos e abençoando minha trajetória.

À minha orientadora, Prof. Dra. Fabíola Traina, pela oportunidade e por todo o crescimento profissional e pessoal proporcionado. Esta parceria que se iniciou na iniciação científica e se estendeu pelo mestrado representou um período de intenso aprendizado, que levarei por toda a minha jornada profissional.

Às funcionárias do Laboratório, Ana Silvia Gouvêa Yamada, Bárbara Santana, Rita de Cássia (Ritinha), Virginia Lipoli Bertini, Diva Hodniki, Priscila Scheucher e Elizabete Audinno (Bete) por todos os auxílios prestados, por tudo que vocês me ensinaram durante este período, além dos momentos de descontração e amizade.

A todos do laboratório de Hematologia da FMRP, principalmente às Fabioletes (migas), Jaqueline Fernandes, Ana Paula Nunes Rodrigues Alves, Fernanda Borges da Silva, Renata Scopin Ribeiro e os representantes masculinos João Agostinho Machado-Neto e Juan Luiz Coelho-Silva, por toda amizade, apoio, conversas e risadas diárias.

Um agradecimento especial ao aluno de pós-doutorado João Agostinho, que ao longo do meu mestrado, representou um grande mentor, agregando muito à minha formação científica.

Aos amigos de outros grupos de pesquisa do laboratório, especialmente ao Gustavo Borges, João Paulo Lopes, André Pinto, Flávia Ramos, Maria Florencia Tellechea (Flor), Lílían Figueiredo, Luciana Yamamoto e Silvia Sánchez.

Ao pessoal do laboratório de Oncologia pediátrica, por todas as ajudas com experimentos e utilização de equipamentos. Em especial, agradeço minhas amigas, Mariana Ruckert, Pamela Viani, Gabriela Molinari e Lenisa Geron.

Agradeço à equipe do Biotério do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais do Hemocentro de Ribeirão Preto, principalmente à Cleide Lúcia Araújo Silva, Fernanda Ursoli e Lucas Souza, por todas as contribuições.

Aos meus pais Antonio Donizeti e Eliana, pelos ensinamentos, incentivo e apoio incessante. Embora nunca tenham tido a oportunidade de frequentar o ensino superior, fizeram o possível e o impossível para proporcionar este feito a mim e à minha irmã, sem medir esforços. À minha irmã Fernanda que representa além de família, uma grande amiga e companheira. Agradeço também minha madrinha Flávia pelo apoio e aos meus avós, por terem contribuído imensamente com a minha formação pessoal e moral. Em especial, agradeço meu avô Olivio, que apesar de não estar mais fisicamente presente, continua sendo minha inspiração e modelo de pessoa.

Ao meu namorado Rafael, pelo companheirismo, incentivo diário para que eu alcance todos meus objetivos e por caminhar ao meu lado nessa busca pelo crescimento profissional e pessoal, fazendo a caminhada mais leve. Ao nosso cachorrinho Costelinha, por ter trazido muita alegria em minha vida.

A todos os familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

Às minhas amigas, Lara Alberici, Flávia Masson, Lenisa Geron, Gabriela Molinari e Letícia Batista, por terem participado de uma época tão importante da minha vida, a graduação, e por continuarem presentes.

Aos meus amigos de Monte Alto, Nathalia Rossigalli, Tamara Gonçalves, Vanessa Amorin, Thaís Miani, Mariana Pezeiro, Milena Braga e Rafael Pupin, que mesmo à distância, continuam a fazer parte da minha vida.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante minha trajetória educacional e aos membros da banca Dra. Daniella Márcia Kerbauy, Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias e Dra. Fernanda Maris Peria por terem encontrado tempo para dedicar na avaliação desse trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado.

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã. ”

Chico Xavier

RESUMO

FENERICH, B. A. **Inibição farmacológica dos substratos do receptor de insulina em neoplasia mieloproliferativa JAK2^{V617F}**. 2017, 110f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A mutação recorrente JAK2^{V617F} é a lesão molecular com maior impacto na fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas (NMP) BCR ABL1 negativas. A ausência de resposta clínica completa ao inibidor seletivo de JAK1/2, ruxolitinibe, indica a necessidade de novas abordagens terapêuticas. Dados recentes sugerem que IGF1R/IRS representa um potencial alvo de inibição para o tratamento das NMP: (i) o substrato do receptor de insulina 2 (IRS2) coopera com JAK2^{V617F} na transformação maligna em NMP; (ii) a desregulação da via de sinalização de IGF1R induz NMP. O composto NT157 foi desenvolvido para inibir IRS1/2 e apresentou efeitos antineoplásicos em neoplasias sólidas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos celulares e moleculares do tratamento com o inibidor de IRS1/2, NT157, isolado e em combinação com ruxolitinibe, em NMP JAK2^{V617F}. Células HEL e SET2 JAK2^{V617F} foram tratadas com veículo, NT157 e/ou ruxolitinibe e submetidas à avaliação da viabilidade celular, apoptose, proliferação, clonogenicidade, ciclo celular, expressão gênica e/ou expressão/ativação proteica. Células primárias de pacientes com policitemia vera foram submetidos a tratamento com NT157 e avaliação de formação espontânea de colônias eritroides. O efeito do NT157 *in vivo* foi avaliado utilizando modelo de xenotransplante de células HEL em camundongos NSG. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA ou t de *Student*. Em células HEL e/ou SET2 JAK2^{V617F}, o tratamento com NT157 promoveu redução da viabilidade, clonogenicidade e proliferação celular, aumentou a apoptose e resultou em parada do ciclo celular em G₂/M ($p<0,05$). Exposição ao NT157 resultou em inibição da fosforilação de STAT3, STAT5 e ERK e na modulação da expressão de 23 oncogenes (*CCND1*, *MYB* e *WT1*) e genes supressores tumorais (*CDKN1A*, *JUN* e *FOS*) em células HEL ($p<0,05$). O tratamento combinado com ruxolitinibe não apresentou efeito potencializador, sendo que a redução da viabilidade nas condições de combinação corresponde ao efeito das monoterapias nas linhagens celulares avaliadas. Em células primárias de pacientes com policitemia vera (n=3), NT157 reduziu a formação espontânea de colônias eritroides

($p < 0,05$). O tratamento *in vivo* com veículo ou NT157 na dose de 70mg/kg, 3 vezes por semana, via intraperitoneal, em modelos de xenotransplante com células HEL em camundongos NSG (n=5 para cada grupo) não apresentou efeitos antineoplásicos. Em conclusão, a inibição farmacológica de IRS1/2 apresentou efeitos antineoplásicos significativos em modelos de linhagens celulares e amostras primárias de pacientes com NMP JAK2^{V617F}. A inibição farmacológica combinada de IRS1/2 e JAK1/2 não potencializou o efeito antineoplásico das monoterapias nos processos celulares investigados. Os resultados dos estudos *in vivo* em modelos de xenotransplante indicam a necessidade de estudos de farmacocinética e farmacodinâmica para o NT157. Os efeitos moleculares identificados permitiram uma melhor compreensão sobre os mecanismos de ação da droga NT157 em NMP.

Palavras-chave: Neoplasia mieloproliferativa. JAK2V617F. NT157. Substratos do receptor de insulina.

ABSTRACT

FENERICH, B. A. **Pharmacological inhibition of insulin receptor substrates in myeloproliferative neoplasm JAK2^{V617F}**. 2017, 110f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The recurrent V617F mutation in JAK2 is a major contributor to the pathogenesis of BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms (MPN). Absence of complete clinical response to ruxolitinib, a JAK1/2 inhibitor, highlights the need for targeting other signaling pathways that contribute to JAK2. Recent data indicate that IGF1R/IRS is a potential target in MPN: (i) insulin receptor substrate 2 (IRS2) cooperates to malignant transformation induced by JAK2^{V617F}, (ii) IGF1R signaling upregulation induces MNP phenotype. NT157 is a synthetic compound designed as IRS1/2 inhibitor and was able to induce anti-neoplastic effects in solid tumors. We, herein, aimed to characterize the molecular and cellular effects of NT157 treatment, combined or not with ruxolitinib, in MPN JAK2^{V617F}. HEL and SET2 JAK2^{V617F} cells were treated or not with vehicle, NT157 and/or ruxolitinib and submitted to evaluation of cell viability assay, apoptosis, proliferation, clonogenicity, cell cycle, gene expression and protein expression/activation. Primary cells from polycythemia vera (PV) patients (n=3) were exposed to NT157 treatment and evaluated for erythropoietin-independent colony formation. NT157 effects *in vivo* were evaluated in a xenograft model of leukemogenesis induced by HEL cells in NSG mice. Statistical analysis was performed using ANOVA or Student's t test. In MPN cell lines, NT157 treatment significantly decreased cell viability, clonogenicity and cell proliferation, increased apoptosis and cell cycle arrest in G₂/M (all $p<0.05$). NT157 exposure resulted in inhibition of STAT3, STAT5 and ERK phosphorylation. NT157 also modulated the expression of 23 oncogenes (*CCND1*, *MYB* and *WT1*) and suppressor tumor genes (*CDKN1A*, *FOS* and *JUN*) in HEL cells ($p<0.05$). In both cell lines, the combined treatment, NT157 plus ruxolitinib, did not potentiate the effects of monotherapies. In primary cells from polycythemia vera patients, NT157 exposition reduced spontaneous erythroid colony formation (all $p<0.05$). *In vivo* treatment with vehicle or NT157 (70mg/kg intraperitoneal), three times a week, showed no antineoplastic effects in NSG mice transplanted with HEL cells (n = 5 for each group). In summary, the IRS1/2

pharmacological inhibitor NT157 displayed remarkable antineoplastic effects in JAK2^{V617F} cells lines and MPN primary cells. The combined treatment of NT157 plus ruxolitinib did not present potentializing effects when compared to the monotherapy. The results of *in vivo* treatment using a xenograft model highlight the need for pharmacokinetic and pharmacodynamic studies for the NT157 compound. The molecular effects identified allowed a better understanding about the mechanisms of NT157 action in MPNs.

Keywords: Myeloproliferative neoplasm. JAK2V617F. NT157. Insulin receptor substrates.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	<i>AKT Serine/Threonine Kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
BCR/ ABL1	Gene de fusão (<i>Breakpoint Cluster Region/ABL Proto-Oncogene 1</i>)
B-RAF	<i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
CALR	Calreticulin (calreticulina)
<i>c-DNA</i>	<i>Complementary DNA (DNA complementar)</i>
C-RAF	<i>C-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
CTH	Célula-tronco hematopoética
CTH-CP	Célula-tronco hematopoética de curto prazo
CTH-LP	Célula-tronco hematopoética de longo prazo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EPOR	<i>Erythropoietin receptor</i>
ERK	<i>extracellular signal–regulated kinases</i>
FOS	<i>Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos
HEL	<i>human erythroleukemia cell line</i>
IGF1	<i>Insulin Like Growth Factor 1</i>
IGF1R	<i>Insulin Like Growth Factor 1 Receptor</i>
IgG	Imunoglobulina G
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
JAK1/2	<i>Janus kinase1/2</i>
JUN	<i>JUN proto-oncogene/AP-1 Transcription Factor Subunit</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MFP	Mielofibrose primária
MO	Medula óssea
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (multiplicidade de infecção)
MPL	<i>MPL proto-oncogene, Thrombopoietin receptor</i>

mTOR	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin</i>
MTT	Metiltiazoltetrazólio
MYB	<i>Myb proto-oncogene</i>
NMP	Neoplasia mieloproliferativa
NOD	<i>non-obese diabetic</i> (diabético não obeso)
NSG	<i>NOD scid gamma</i> (linhagem de camundongo)
p21	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
PI	<i>Propidium iodide</i> (iodeto de propídeo)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PIIB	Processamento de imagem baseado em bioluminescência
PLC	Progenitor linfoide comum
PMC	Progenitor mieloide comum
PMP	Progenitor multipotente
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domains</i>
PV	Policitemia vera
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (meio do instituto Memorial Roswell Park)
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> (síndrome da imunodeficiência severa combinada)
SET2	<i>Human megakaryoblastic cell line</i>
SFB	Soro fetal bovino
SH2	<i>Src Homology 2 domain</i>
Shc	<i>SHC-transforming protein</i>
SMD	Síndrome mielodisplásica
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TE	Trombocitemia essencial
V617F	Mutação pontual no códon 617 de JAK2
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde-OMS)
WT1	<i>Wilms Tumor 1</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo hierarquizado da hematopoese humana. Esquema simplificado da produção hierárquica das células sanguíneas na medula óssea. Esse processo tem a CTH em seu ápice e culmina na formação de todas as linhagens maduras do sangue periférico. A CTH pluripotencial de longo prazo pode ser autorrenovada ou progredir para CTH de curto prazo, que se diferencia em progenitores comprometidas com linhagens mieloide e linfóide. **CTH-LP** = célula-tronco hematopoética de longo prazo. **CTH-CP** = célula-tronco hematopoética de curto prazo; as setas indicam a capacidade de autorrenovação; **PMP** = progenitor multipotente; **PMC** = progenitor mieloide comum; **PLC** = progenitor linfóide comum. A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>. 25

Figura 2. Representação esquemática da estrutura da proteína e mutações que afetam o domínio JH2 de JAK2. A proteína JAK2 apresenta sete domínios (JH1-7), nomeados da direção C para N terminal. JH1: apresenta atividade catalítica; JH2: pseudoquinase que regula negativamente a atividade de JH1; JH3 e JH4: compartilham homologia com Src sendo denominados SH2; JH5-JH7 correspondem à região amino terminal e são denominados FERM. Mutações em JAK2 (V617F e mutações no éxon 12) levam à perda da função do domínio JH2. A perda da regulação negativa de JH2 sobre JH1 (capacidade autoinibitória da proteína) resulta no aumento da atividade tirosinoquinase de JAK2 mesmo na ausência de fatores de crescimento e citocinas, com consequente ativação constitutiva da via JAK/STAT. A ilustração foi baseada na publicação de Quintás-Cardama e colaboradores [58]. 29

Figura 3. Via de sinalização mediada pelas proteínas IRS1/2 e a cooperação entre JAK2^{V617F} e IRS2 em NMP. **Painel esquerdo:** Vias de sinalização de IRS1/2. As proteínas adaptadoras citoplasmáticas IRS1/2 são recrutadas e ativadas através da fosforilação em tirosina nos domínios PH/PTB. A associação das proteínas IRS com seus receptores que possuem atividade tirosinoquinase (receptor da insulina [IR], receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 [IGF1R]) resulta na fosforilação do IRS1/2 em seus resíduos de tirosina na porção C-terminal. Essa ativação gera sítios de ligação e recrutam proteínas efetoras que participam da sinalização celular das vias JAK/STAT, PI3K/AKT e MAPK (via canônica), regulando diversos processos biológicos, incluindo proliferação celular, síntese proteica, sobrevivência celular e expressão gênica em tecidos específicos. Em modelos murinos específicos, o IRS2 também pode interagir com JAK2 sob estímulo de angiotensina II ou leptina e ativar STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK. **Painel direito:** Em neoplasia mieloproliferativa (NMP) JAK2^{V617F}, IRS2 associa-se com JAK2^{V617F}, ativa STAT5, aumenta a proliferação, clonogenicidade e sobrevivência celular. A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>. 32

Figura 4. Modelo proposto para a ação de NT157 em células neoplásicas. (1) NT157 se liga a um sítio alostérico do receptor IGF1R provocando alterações

conformacionais, levando à dissociação das proteínas IRS do receptor, permitindo que: (2) o receptor interaja mais fortemente com a proteína adaptadora Shc, levando a ativação de C-RAF e aumento na expressão de ERK; (3) As proteínas IRS citoplasmáticas recebem extensiva fosforilação em serina, sendo marcadas para degradação via proteassoma, sendo então degradadas, provocando a inibição de IRS1/2 de forma duradoura. (4) Alternativamente, NT157 inibe STAT3 de modo independente da inibição de IRS1/2, através da ativação de fosfatases. O modelo foi baseado na publicação de Reuveni e colaboradores e atualizado com base na publicação de Flashner-Abramson, que descreve a inibição de STAT3 após o tratamento com NT157 [100,103]. A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>..... 34

Figura 5. Organograma do esquema de tratamento e avaliações realizadas. O composto NT157 foi utilizado isolado (em diferentes concentrações por 24, 48 e 72 horas) e em combinação com ruxolitinibe (48 horas) em células HEL e SET2. Para o tratamento combinado, utilizou-se um esquema de combinação de doses diferente para cada linhagem, de acordo com a sensibilidade das células ao composto. A viabilidade celular e apoptose foram avaliadas para ambas as células para validação dos resultados. Os demais ensaios (funcionais, expressão gênica, expressão/ativação proteica) foram realizados em linhagem celular HEL; * condições de tratamento utilizadas e avaliações realizadas em células SET2 para validação dos resultados obtidos em células HEL..... 40

Figura 6. Determinação do IC₅₀ para o tratamento com NT157 em linhagem celular HEL. (A) Curva dose-resposta, indicando o efeito do tratamento com NT157 em relação à concentração, as doses estão representadas no eixo X, enquanto os efeitos (morte celular) estão representados no eixo Y. (B) Curva do efeito médio do composto NT157, no eixo X encontram-se a fração de células mortas e no eixo Y, a projeção de doses. A dose média é representada pela concentração necessária para causar o efeito médio, ou seja, metade do efeito máximo. (C) Tabela dos valores de IC₅₀ para cada tempo de tratamento. Para o tratamento com NT157, foram encontrados os valores de 3,1 µM para 24 horas, 0,68 µM para 48 horas e 0,72 µM para 72 horas. 53

Figura 7. Tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular em células HEL JAK2^{V617F}. (A) A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, em células HEL tratadas ou não com NT157 em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM) por 24, 48 e 72 horas. Os gráficos em barra representam a média ± desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle, obtidas de quatro experimentos independentes (B) A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo em células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 µM) por 24, 48 e 72 horas, utilizando Anexina V/PI. Um dot plot ilustrativo é apresentado; os dois quadrantes da direita (quadrantes 2 e 3) contêm a população de células apoptóticas (Anexina+). (C) Os gráficos em barra representam a média ± desvio padrão de ao menos três experimentos independentes de apoptose. Os valores de p indicados nos gráficos correspondem a: ** p<0,001, *** p<0,0001 para células tratadas com NT157 vs. controle; teste ANOVA e pós teste Bonferroni. 55

Figura 8. Tratamento com NT157 provoca aumento nos níveis de caspases clivadas 3, 8 e 9. Western blot para análise dos níveis de caspases 3, 8 e 9 (total e clivada) em

extratos proteicos de células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) por 24 horas; membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das respectivas proteínas totais e/ou fosforiladas e a actina, e reveladas com o reagente SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate e o sistema Gel Doc XR+. 56

Figura 9. Tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular em células SET2^{V617F} e induz apoptose nas doses mais altas. (A) A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, em células SET2 tratadas ou não com NT157 em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) por 24, 48 e 72 horas. Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle, obtidas de quatro experimentos independentes. (B) A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo em células SET2 tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) por 24, 48 e 72 horas, utilizando Anexina V/PI. Um dot plot ilustrativo é apresentado; os dois quadrantes da direita (quadrantes 2 e 3) contêm a população de células apoptóticas (Anexina+). (C) Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão de ao menos três experimentos independentes de apoptose. Os valores de p indicados nos gráficos correspondem a: *p<0,05, *** p<0,0001 para células tratadas com NT157 vs. controle; teste ANOVA e pós teste Bonferroni. 58

Figura 10. Tratamento com NT157 reduz a proliferação celular em HEL JAK2^{V617F}. A proliferação celular é quantificada a partir da intensidade de fluorescência (MIF) da marcação com anti-Ki-67-FITC (A) Histogramas representativos de um experimento contendo a MIF da marcação com anti-Ki-67 após 24 horas de exposição ao NT157. (B) Histogramas com os picos das MIF de Ki-67 para todas as condições avaliadas; após 24 horas de exposição ao NT157, cada condição está representada em uma cor e pode ser verificada na legenda no painel esquerdo. (C) O gráfico em barra representa a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes após 24 horas de tratamento. Os valores de p indicados nos gráficos correspondem a: **p<0,001, ***p<0,0001 para células tratadas com NT157 vs. controle; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni..... 59

Figura 11. Exposição de longo prazo ao composto NT157 reduz a formação de colônias em células HEL JAK2^{V617F}. Colônias contendo células viáveis foram detectadas por MTT após 10 dias de cultura. Células HEL foram tratadas com NT157 em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) e normalizadas em relação às células não tratadas. As imagens das colônias são representativas de um experimento e o gráfico em barras apresenta a média $\pm$ desvio padrão de cinco experimentos independentes; os valores de p encontram-se indicados no gráfico; *p<0,05; teste ANOVA e pós teste Bonferroni..... 60

Figura 12. NT157 induz aumento da população em G₂/M associado à redução de células em G₀/G₁. (A) A progressão do ciclo celular foi determinada pelo kit BD Cycletest™ Plus DNA Reagent em células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2, 0,4 e 0,8 μ M) por 24 horas. Um histograma representativo para cada condição é ilustrado; a fase do ciclo celular é definida de acordo com a quantidade de DNA: azul (células em G₀/G₁), verde (células na fase S) e vermelho (G₂/M). (B) O gráfico em barra representa a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células em G₀/G₁, S e G₂/M após tratamento com NT157 por 24 horas. Os valores de p encontram-se indicados no

gráfico; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ para as amostras tratadas com NT157 vs. células não tratadas; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. 61

Figura 13. Tratamento com NT157 reduziu os níveis de proteínas IRS1 e IRS2. Western blot para análise dos níveis de IRS1 e IRS2 em extratos totais de células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) por 24 horas; as membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das proteínas de interesse e da α -tubulina, utilizada como controle endógeno; a revelação foi realizada com o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, em aparelho Gel Doc XR+. Blot representativo de um dos três experimentos independentes realizados para a detecção dos níveis de expressão de expressão de IRS1 e IRS2. 62

Figura 14. Exposição ao composto NT157 inibe a fosforilação de STAT3, STAT5 e ERK1/2 de modo dose-dependente em células HEL. Western blot para análise dos níveis de p-STAT3, STAT3, p-ERK1/2, ERK1/2, p-STAT5 e STAT5 em extratos totais de células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) por 24 horas; as membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das proteínas de interesse e da actina, utilizada como controle; a revelação foi realizada com o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, em aparelho Gel Doc XR+. Blot representativo de um dos três experimentos independentes realizados para a detecção dos níveis de expressão e ativação de STAT3, STAT5 e ERK. 63

Figura 15. NT157 modulou a expressão de 23 oncogenes e genes supressores tumorais em células HEL JAK2^{V617F}. (A) Heat map ilustrativo, contendo os dados do PCR array (expressão gênica) para células tratadas ou não com NT157 (0,8 μM). Para as células HEL não tratadas, os níveis de RNAm são expressos como fold change = 1 e os genes que apresentaram fold change ≥ 1.5 depois do tratamento com NT157 foram apresentados no heat map. Foram utilizados dois experimentos independentes para cada condição; cor verde indica níveis reduzidos de RNAm e vermelho, aumento nos níveis de expressão. (B) Validação de seis genes envolvidos na progressão do ciclo celular e apoptose em um número maior de experimentos ($n=5$). Os valores de p encontram-se indicados nos gráficos; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; Teste t de Student. 65

Figura 16. Ruxolitinibe 0,3 μM inibe a fosforilação das proteínas STAT3 e STAT5 em células HEL. Blot representativo de um dos experimentos independentes de Western blot para a avaliação dos efeitos das diferentes concentrações de ruxolitinibe sobre a ativação das proteínas STAT em extratos totais de células HEL tratadas ou não com ruxolitinibe (0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1 μM) por 24 horas; as membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das proteínas de interesse e da actina, utilizada como controle; a revelação foi realizada com o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, em aparelho Gel Doc XR. 67

Figura 17. Em linhagem celular HEL JAK2^{V617F}, ruxolitinibe não potencializou os efeitos do tratamento com NT157 na redução da viabilidade. (A) A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, em células HEL tratadas ou não em diferentes condições (ruxolitinibe [Rx] 0,3; NT157 0,4; NT157 0,8; ruxolitinibe + NT157 0,4; ruxolitinibe + NT157 0,8 μM) por 48 horas. Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle, obtidas de seis experimentos independentes. (B) A apoptose foi avaliada por

citometria de fluxo em células HEL tratadas ou não em diferentes condições (ruxolitinibe 0,3; NT157 0,4; NT157 0,8; ruxolitinibe + NT157 0,4; ruxolitinibe + NT157 0,8 μ M) por 48 horas, utilizando anexina V/PI. Um dot plot representativo é apresentado; os dois quadrantes da direita (quadrantes 2 e 3) contêm a população de células apoptóticas (anexina+). (C) O gráfico em barra representa a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes de apoptose. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação à monoterapia com ruxolitinibe, † $p < 0,05$ em relação à monoterapia com NT157; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni..... 69

Figura 18. Em linhagem celular SET2 JAK2^{V617F}, ruxolitinibe não potencializou os efeitos do tratamento com NT157 na redução da viabilidade. (A) A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, em células SET2 tratadas ou não em diferentes condições (ruxolitinibe [Rx] 0,3; NT157 1,6; NT157 3,2; ruxolitinibe + NT157 1,6; ruxolitinibe + NT157 3,2 μ M) por 48 horas. Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle, obtidas de seis experimentos independentes. (B) A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo em células SET2 tratadas ou não em diferentes condições (ruxolitinibe 0,3; NT157 1,6; NT157 3,2; ruxolitinibe + NT157 1,6; ruxolitinibe + NT157 3,2 μ M) por 48 horas, utilizando anexina V/PI. Um dot plot representativo é apresentado; os dois quadrantes da direita (quadrantes 2 e 3) contêm a população de células apoptóticas (anexina+). (C) O gráfico em barra representa a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes de apoptose. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação à monoterapia com ruxolitinibe, † $p < 0,05$ em relação à monoterapia com NT157; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni..... 71

Figura 19. Em linhagem celular HEL JAK2^{V617F}, ruxolitinibe reduz a parada em G₂/M induzida por NT157. (A) A progressão do ciclo celular foi determinada pelo BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit em células HEL tratadas ou não (Ø; Ruxo 0,3; NT 0,4; NT 0,8; Ruxo 0,3 + NT 0,4; Ruxo 0,3 + NT 0,8 μ M) por 24 horas. Um histograma representativo para cada condição é ilustrado; a fase do ciclo celular é definida de acordo com a quantidade de DNA: azul (células em G₀/G₁), verde (células na fase S) e vermelho (G₂/M). (B) Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células em G₀/G₁, S e G₂/M após tratamento. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação à monoterapia com ruxolitinibe, † $p < 0,05$ em relação à monoterapia com NT157; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. 73

Figura 20. NT157 reduz a formação espontânea de colônias eritroides em células primárias de pacientes com policitemia vera (PV). (A) Células mononucleares de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com PV ao diagnóstico, foram cultivadas em metilcelulose, suplementada com citocinas, exceto EPO e na ausência ou presença de NT157 e/ou ruxolitinibe. (A) Gráficos em barra com média $\pm$ desvio das duplicatas para cada paciente avaliado. (B) Dot plot comparando os resultados obtidos para todas as amostras de pacientes avaliadas (n=3); as linhas horizontais representam a média $\pm$ desvio padrão. Os valores de p indicados nos gráficos correspondem a: * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ para células tratadas vs. controle; teste ANOVA e pós teste Bonferroni. (C) Imagens representativas de cada condição de tratamento para uma das amostras avaliadas. As fotos foram obtidas em estereomicroscópio Leica MZFLIII, acoplado a

câmera Leica DFC 500, através do programa LAS V3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)..... 75

Figura 21. Bioluminescência in vitro das células HEL transformadas para expressar luciferase. Atividade biológica da luciferase em diferentes concentrações de células HEL^{luc}. A intensidade de bioluminescência é medida em fótons por segundo. O sinal da bioluminescência é diretamente proporcional ao número de células HEL que expressam luciferase biologicamente ativa após transformação por lentivírus. A aquisição do sinal de bioluminescência foi realizada através do sistema IVIS Lumina. 76

Figura 22. Rastreamento das células HEL^{luc} xenotransplantadas em camundongos NSG. (A) Células HEL^{luc} foram transplantadas em camundongos NSG (n=6). Detecção da bioluminescência in vivo para um dos animais ao longo da progressão da doença nos dias D+7, D+14 e D+21. O sinal emitido indica que as células sobreviveram e povoaram a medula óssea dos camundongos receptores. (B) Quantificação da bioluminescência emitida pelas células HEL^{luc} nos dias D+7, D+14 e D+21. A intensidade de bioluminescência é medida em fótons por segundo e está expressa em Log¹⁰. O sinal da bioluminescência é diretamente proporcional ao número de células HEL que expressam luciferase biologicamente ativa. A aquisição das imagens foi realizada em sistema IVIS Lumina..... 77

Figura 23. Curva de sobrevida dos camundongos NSG xenotransplantados. O eixo x representa o dia pós transplante e o eixo y, a porcentagem de sobrevivência. Todos os animais (n=6) morreram entre o 25º e 26º dias após receberem as células. A sobrevida dos camundongos foi descrita através da curva de Kaplan Meier..... 78

Figura 24. Tratamento com NT157 em camundongos NSG xenotransplantados. (A) Rastreamento das células HEL^{luc} xenotransplantadas em camundongos NSG. As Células HEL^{luc} foram transplantadas em camundongos NSG (n=10). Quantificação da bioluminescência emitida pelas células HEL^{luc} nos dias D+3, D+7, D+14 e D+21 para os animais tratados com veículo (n=5) e NT157 (n=4) A intensidade de bioluminescência foi medida em fótons por segundo e está expressa em Log¹⁰. O sinal da bioluminescência é diretamente proporcional ao número de células HEL que expressam luciferase biologicamente ativa. A aquisição das imagens foi realizada em sistema IVIS Lumina. (B) Curva de sobrevida dos camundongos NSG xenotransplantados. O eixo x representa o dia pós transplante e o eixo y, a porcentagem de sobrevivência. Três animais de cada grupo morreram no 24º e os demais, no 27º dia após receberem as células. A sobrevida dos camundongos foi descrita através da curva de Kaplan Meier. (C) Tabela com os dados de peso corpóreo (gramas) e do baço de cada um dos animais no dia da realização do sacrifício. (D) Imagem representativa dos baços de três animais de cada grupo..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sobrevida e ocorrência de progressão para mielofibrose secundária e LMA em NMP.....	27
Tabela 2. Descrição das linhagens celulares utilizadas	39
Tabela 3. Anticorpos contra as proteínas de interesse, totais e fosforiladas, avaliadas por Western blot.	44
Tabela 4. Sequência dos iniciadores utilizados para validação do PCR array	46
Tabela 5. Dados clínicos dos pacientes com policitemia vera (PV) avaliados no estudo	47
Tabela 6. Condições do tratamento combinado para cada linhagem celular.....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Hematopoese	24
1.2. Neoplasias mieloproliferativas	25
1.3. Lesões moleculares e patogênese das NMP	27
1.4. Mutação JAK2^{V617F}	28
1.5. Inibidores de JAK2	29
1.6. Vias de sinalização mediadas pelos substratos do receptor de insulina (IRS)	30
1.7. Inibidor farmacológico de IRS1/2.....	33
1.8. Hipótese do trabalho	34
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1. Linhagens celulares	39
3.2. Inibidores farmacológicos.....	40
3.3. Ensaaios funcionais	40
3.3.1. Avaliação da viabilidade celular.....	40
3.3.2. Avaliação de apoptose.....	41
3.3.3. Avaliação da proliferação celular	41
3.3.4. Análise do ciclo celular	42
3.3.5. Avaliação da clonogenicidade	42
3.4. Ensaios moleculares	42
3.4.1. Análise da expressão e ativação proteica por Western blot.....	42
3.4.2. Avaliação do perfil de expressão gênica por PCR array	44
3.4.3. Validação por PCR quantitativo.....	45
3.5. Formação espontânea de colônias eritroides em células primárias	46
3.6. Padronização de um modelo de camundongos xenotransplantados com linhagem celular humana HEL JAK2^{V617F}	47
3.6.1. Animais	47
3.6.2. Geração de células HEL expressando luciferase 2.....	48
3.6.3. Processamento de imagem baseado em bioluminescência	48
3.6.4. Xenotransplante	49
3.6.5. Experimento preliminar para tratamento com NT157 in vivo.....	49
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Efeitos do tratamento isolado com inibidor de IRS1/2, NT157, em células JAK2^{V617F}	52
4.1.1. NT157 reduz a viabilidade celular e induz apoptose de modo dose e tempo dependente em células HEL JAK2 ^{V617F}	52
4.1.2. NT157 aumenta a clivagem de caspases 3, 8 e 9.....	54
4.1.3. Em linhagem celular SET2, NT157 reduz a viabilidade e induz apoptose nas doses mais altas	56

4.1.4. NT157 reduz a proliferação celular em células HEL JAK2 ^{V617F}	57
4.1.5. Exposição prolongada ao composto NT157 reduz a formação de colônias	59
4.1.6. Tratamento com NT157 induz parada do ciclo celular em G ₂ , associada com redução da população G ₀ /G ₁	60
4.1.7. Análise da expressão proteica confirma que o composto NT157 inibiu as proteínas IRS1 e IRS2 em linhagem celular HEL JAK2 ^{V617F}	61
4.1.8. NT157 modula a via de sinalização JAK2/STAT em células HEL JAK2 ^{V617F}	62
4.1.9. NT157 reduz a expressão de oncogenes e aumenta a expressão de genes envolvidos na indução apoptótica.....	63
4.2. Efeitos do tratamento combinado de ruxolitinibe e NT157 em células JAK2^{V617F} ...	65
4.2.1. Em linhagem celular HEL JAK2 ^{V617F} , ruxolitinibe não potencializou os efeitos do tratamento com NT157	67
4.2.2. Em linhagem celular SET2 JAK2 ^{V617F} , ruxolitinibe não potencializou os efeitos do tratamento com NT157	70
4.2.3. Em linhagem celular HEL JAK2 ^{V617F} , ruxolitinibe reduz a parada em G ₂ /M induzida por NT157	72
4.3. NT157 inibe a formação de colônias eritroides independente de eritropoetina em células primárias de pacientes com PV	74
4.4. Padronização de um modelo de camundongos xenotransplantados com linhagem celular humana HEL JAK2^{V617F}	76
4.4.1. Confirmação da transformação das células HEL através da atividade biológica da luciferase	76
4.4.2. Acompanhamento da leucemogênese e avaliação da sobrevida.....	77
4.4.3. Tratamento com NT157 em camundongos NSG xenotransplantados.....	78
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hematopoese

A gênese das diferentes linhagens celulares que compõem o sangue periférico é dada através de um processo denominado hematopoese [1]. Esta produção ocorre inicialmente, durante o desenvolvimento fetal, em ilhotas sanguíneas pertencentes ao saco vitelínico e, por volta da sétima até a décima oitava semana gestacional, ocorre predominantemente no fígado [2]. No entanto, progressivamente, a medula óssea (MO) passa a deter tal função, sendo que no adulto representa a única fonte de produção de células sanguíneas [2,3].

Diariamente, cerca de um trilhão de novas células são originadas na medula óssea de indivíduos adultos, o que caracteriza o sangue como um dos tecidos mais regenerativos [4]. Em humanos, a hematopoese é um processo hierárquico, apresentando um precursor comum no ápice do processo, a célula-tronco hematopoética (CTH) [4,5]. As CTHs constituem menos de um por cento das células da MO e são caracterizadas pela capacidade de assumir diferentes destinos, incluindo autorrenovação, quiescência e diferenciação [6–8]. Essas funções permitem que essa pequena porção de células tenha papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e regeneração do sistema hematopoético [9,10].

A hematopoese ocorre a partir de uma CTH pluripotencial de longo prazo, que possui capacidade de autorrenovação e progride para CTH de curto prazo, que se diferencia nas células comprometidas com linhagens mieloide e linfoide. A divisão das CTH na medula óssea ocorre de maneira assimétrica, onde uma CTH dá origem a duas células filhas distintas, uma mantém a identidade de CTH e a outra se transforma em um progenitor mais diferenciado [11,12]. Um precursor mieloide comum dá origem a progenitores mais diferenciados e finalmente às células maduras da série eritrocítica, granulocítica e megacariocítica, e o precursor linfoide origina os linfócitos T e B e células natural killer [4,13]. O processo hierarquizado da hematopoese está ilustrado na **Figura 1**.

A hematopoese depende não apenas das CTH, mas também de um microambiente normal capaz de produzir fatores de crescimento, favorecer a interação entre os distintos tipos celulares e acomodar as células em desenvolvimento [2]. A hematopoese é finamente regulada através de fatores de crescimento e citocinas, que

ativam vias de sinalização envolvidas em processos essenciais, incluindo proliferação, apoptose e diferenciação [14,15]. Falhas em algum ponto do processo hematopoético podem resultar em neoplasias mieloides, caracterizadas pela redução ou pela proliferação exacerbada de uma ou mais linhagens celulares do sangue periférico [15]. Dentro deste grupo de malignidades clonais são encontradas as síndromes mielodisplásicas (SMD), as neoplasias mieloproliferativas (NMP), as SMD/NMP e as leucemias agudas [16–18].

Figura 1. Processo hierarquizado da hematopoese humana. Esquema simplificado da produção hierárquica das células sanguíneas na medula óssea. Esse processo tem a CTH em seu ápice e culmina na formação de todas as linhagens maduras do sangue periférico. A CTH pluripotencial de longo prazo pode ser autorrenovada ou progredir para CTH de curto prazo, que se diferencia em progenitores comprometidos com linhagens mielóide e linfóide. **CTH-LP** = célula-tronco hematopoética de longo prazo. **CTH-CP** = célula-tronco hematopoética de curto prazo; as setas indicam a capacidade de autorrenovação; **PMP** = progenitor multipotente; **PMC** = progenitor mielóide comum; **PLC** = progenitor linfóide comum. A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

1.2. Neoplasias mieloproliferativas

As NMPs se originam a partir da transformação de uma CTH. Esta célula-tronco sofre alterações moleculares e origina precursores hipersensíveis ou independentes da sinalização por citocinas e fatores de crescimento para a proliferação celular [19]. Dessa

forma, as NMPs são caracterizadas pela expansão exacerbada de células maduras e funcionais de uma ou mais linhagens mieloides [20].

As NMPs são definidas de acordo com a Classificação dos tumores hematopoéticos e linfoides da Organização Mundial da Saúde (WHO) de 2008 [17,21,22]. Esta classificação foi revisada em 2016, incorporando-se relevantes avanços para o diagnóstico e prognóstico. As categorias de classificação das NMP não foram alteradas significativamente pela revisão, no entanto, a inclusão de novas lesões genéticas e características morfológicas trouxe significativos impactos nos critérios diagnósticos para algumas entidades da doença [23].

Dentro deste grupo de neoplasias, encontra-se a leucemia mieloide crônica, definida pela presença do gene de fusão BCR-ABL e as neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas [17,21]. As NMP clássicas, também denominadas BCR-ABL1 negativas, compreendem a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP). Estas neoplasias compartilham características, tais como, medula óssea hipercelular, propensão a ocorrência de trombose e hemorragias, além de risco de progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) [20].

Em PV, a linhagem eritroide é predominantemente afetada, no entanto, também pode haver uma hiperplasia variável das linhagens megacariocítica/granulocítica [23,24]. Células provenientes de PV apresentam a capacidade de formação de colônias eritroides, mesmo na ausência do fator de crescimento eritropoetina (EPO) [25–27]. Esse mecanismo resulta na produção excessiva de eritrócitos. Pacientes acometidos com PV apresentam redução na sobrevida, aumento do risco de eventos de tromboembolismo e hemorragias, sintomas constitucionais intensos e propensão para evoluir clinicamente para mielofibrose primária e LMA [28–31].

A TE é caracterizada pela trombocitose e presença de hiperplasia megacariocítica [23,32]. A doença pode apresentar complicações relacionadas ao processo de coagulação, incluindo trombose e sangramentos [33,34]. Ainda que a PV e TE afetem linhagens mieloides distintas, é notável que as duas entidades compartilham características clínicas e moleculares, além de ambas apresentarem um curso natural semelhante, culminando na ocorrência de eventos hemorrágicos, e/ou na progressão para mielofibrose secundária e LMA [35].

Dentre as NMPs, a MFP é a entidade mais heterogênea, tendo como característica principal, presença de fibrose na medula óssea e hiperplasia megacariocítica [23,34]. Em estágios iniciais da MFP, a proliferação mieloide ocorre

predominantemente na medula óssea e à medida que a doença progride, atinge sítios extramedulares, como o baço [36]. A fibrose medular pode levar a uma hematopoese ineficaz e progressiva falência medular [22,37].

Uma vez que os limites entre as três categorias das NMP não são bem estabelecidos, visto que apresentam muitas similaridades clínicas e fisiopatológicas, algumas subcategorias são definidas, como a MFP pré-fibrótica. Essa entidade apresenta um fenótipo de TE ao diagnóstico, mas com pior prognóstico e alta probabilidade de progredir para MFP [23,32,38,39]. Tefferi e colaboradores analisaram comparativamente as três categorias de NMP em relação à sobrevida e progressão da doença em uma coorte de 826 pacientes [40]. Uma síntese dos resultados do estudo encontram-se na **Tabela 1** [40]. Resumidamente, todas as categorias de NMP BCR/ABL1 negativa apresentam redução da sobrevida global em comparação com a população normal, no entanto, a taxa relativa de sobrevida é menor em MFP, seguida de PV e TE, respectivamente [31,40,41].

Tabela 1. Sobrevida e ocorrência de progressão para mielofibrose secundária e LMA em NMP

Prognóstico/Categoria NMP	TE	PV	MFP
Sobrevida (anos)	19,8	13, 5	5,9
Sobrevida ≤60 anos (anos)	32,7	23,8	14,6
Evolução fibrótica	9,9%	12,7%	-
Transformação leucêmica	4,1%	6,7%	12,7%

Análise de uma coorte de 826 pacientes com NMP do Hospital Mayo Clinic (Rochester, EUA). O estudo avaliou comparativamente as categorias da NMP quanto à sobrevida, sobrevida em pacientes com idade inferior a 60 anos, incidência de evolução fibrótica (desenvolvimento de mielofibrose secundária) e progressão para transformação blástica [34,40].

1.3. Lesões moleculares e patogênese das NMP

Como relatado anteriormente, as três categorias de NMP apresentam sobreposição das características clínicas e evolução natural da doença. Esse contínuo entre as entidades diagnósticas é reflexo das bases genéticas e da fisiopatologia molecular das NMP [32]. As NMPs surgem a partir de alterações moleculares na CTH que passa a apresentar vantagem proliferativa e expansão clonal. Os clones neoplásicos apresentam hipersensibilidade ou independência dos fatores de crescimento, o que culmina na expansão exacerbada das linhagens mieloides [42].

A desregulação direta ou indireta da via de sinalização *Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT), provocada, na maioria das vezes, por mutações somáticas adquiridas, representa o maior fator de contribuição para a fisiopatologia das NMP clássicas [43–45]. As principais mutações que culminam na ativação constitutiva dessa via são as mutações que afetam JAK2 (éxon 12 e éxon 14) [46–49], mutações no gene do receptor da trombopoetina (gene MPL) [50] e mutações na calreticulina (CALR) [51,52]. Todas essas mutações são compartilhadas entre as diferentes categorias das NMP, com diferentes taxas de recorrência [32,51].

1.4. Mutação JAK2^{V617F}

Uma das lesões moleculares mais frequentes e com maior contribuição nas NMP BCR-ABL1 negativas corresponde à mutação pontual V617F em JAK2, um componente da via de sinalização JAK/STAT, que corresponde ao principal mecanismo de comunicação de uma ampla gama de citocinas e fatores de crescimento [53]. Em 2005, a mutação JAK2^{V617F} foi identificada como recorrente em pacientes com PV, TE e MFP [54]. Em PV, a incidência da mutação JAK2^{V617F} é superior a 90%, enquanto que na TE e MFP, 50-60% dos pacientes apresentam o alelo mutado [20]. Devido à alta frequência de ocorrência, esta alteração genética foi definida como marcador molecular, contribuindo significativamente para o diagnóstico das NMP e para o desenvolvimento de inibidores seletivos [46,55].

A mutação JAK2^{V617F} resulta na substituição de um aminoácido valina por uma fenilalanina no códon 617 de JAK2, afetando a domínio JH2 desta proteína [47]. JAK2 apresenta domínios homólogos, JH1 e JH2, sendo que o primeiro apresenta atividade tirosinoquinase e o segundo é um domínio pseudoquinase [56]. O domínio pseudoquinase apresenta uma importante função regulatória para JAK2, uma vez que exerce efeito autoinibitório, regulando negativamente a atividade catalítica de JH1 na ausência de estímulos [57]. A mutação JAK2^{V617F} e mutação no éxon 12 resultam na perda desta capacidade autoinibitória (**Figura 2**). Desta forma, estas alterações moleculares provocam autofosforilação de JAK2 mesmo na ausência da ligação de citocinas e fatores de crescimento [46,53].

Figura 2. Representação esquemática da estrutura da proteína e mutações que afetam o domínio JH2 de JAK2. A proteína JAK2 apresenta sete domínios (JH1-7), nomeados da direção C para N terminal. JH1: apresenta atividade catalítica; JH2: pseudoquinase que regula negativamente a atividade de JH1; JH3 e JH4: compartilham homologia com Src sendo denominados SH2; JH5-JH7 correspondem à região amino terminal e são denominados FERM. Mutações em JAK2 (V617F e mutações no éxon 12) levam à perda da função do domínio JH2. A perda da regulação negativa de JH2 sobre JH1 (capacidade autoinibitória da proteína) resulta no aumento da atividade tirosinoquinase de JAK2 mesmo na ausência de fatores de crescimento e citocinas, com consequente ativação constitutiva da via JAK/STAT. A ilustração foi baseada na publicação de Quintás-Cardama e colaboradores [58].

A proteína JAK2 participa da sinalização mediada pela ligação de eritropoetina, trombopoetina, interleucina 3, fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) [20,59]. Durante o processo normal de sinalização celular, a ligação de citocinas específicas à proteína JAK2 provoca a fosforilação da mesma [60]. Uma vez ativada, esta proteína quinase fosforila proteínas da família STAT, resultando em ativação de vias de sinalização intracelular, como STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK [60–62]. A mutação JAK2^{V617F} provoca autofosforilação de JAK2 e ativação constitutiva destas vias, contribuindo para a fisiopatologia das NMPs [54,63]

1.5. Inibidores de JAK2

A partir da identificação de JAK2 como um importante alvo terapêutico, diversos grupos de pesquisa têm trabalhado no desenvolvimento de pequenas moléculas disponíveis para tratamento oral, capazes de inibir a atividade tirosinoquinase da proteína alvo [54,64]. Dentre alguns dos inibidores desenvolvidos estão o ruxolitinibe (NCB018424); lestarutinib (CEP701) e NS018, gandotinib (LY2784544), momelotinib CYT387, dentre outros [65–67].

O ruxolitinibe foi o primeiro inibidor a passar por testes clínicos em 2007 e foi aprovado para tratamento da MFP e PV, em 2011 e 2014, respectivamente. O composto é bem tolerado pelos pacientes, apresentando baixa toxicidade [65,68]. O tratamento com ruxolitinibe promove redução de citocinas inflamatórias e da esplenomegalia, amenizando sintomas constitucionais e proporcionando melhor qualidade de vida. No entanto, este fármaco não é capaz de reverter a fibrose na medula óssea [69–71]. O impacto de ruxolitinibe sobre a sobrevida permanece uma questão em aberto [72,73].

Diante deste cenário, a ausência de uma resposta clínica completa na maioria dos pacientes indica a necessidade de estudos com inibidores farmacológicos de outras proteínas envolvidas na via de sinalização JAK2/STAT. Essas novas abordagens terapêuticas, utilizando inibidores isolados ou em combinação com ruxolitinibe, podem representar uma alternativa para o tratamento das NMPs [74,75]. Algumas destas pesquisas encontram-se em estudos pré-clínicos e tem apresentado resultados promissores [76–78].

1.6. Vias de sinalização mediadas pelos substratos do receptor de insulina (IRS)

A partir da necessidade de se investigar genes e proteínas envolvidas em vias de sinalização importantes para a proliferação celular, e tendo em vista a importância do estudo de proteínas que conectam importantes fatores de crescimento na hematopoese, a via de sinalização mediada por IGF1R/IRS representa um potencial alvo para a inibição em NMP JAK2^{V617F}.

Os substratos do receptor de insulina (IRS) constituem uma família de quatro proteínas adaptadoras citoplasmáticas (IRS1-4) identificadas inicialmente por seu papel na sinalização da insulina. IRS1 foi descrito em 1985 e identificado em *immunoblotting* anti-fosfo-tirosina após estimulação por insulina [79]. IRS2 foi inicialmente denominado 4PS e descrito como um substrato alternativo do receptor de insulina em células derivadas de camundongos *knockout* para IRS1 e estimuladas com insulina [80].

As proteínas IRS não possuem atividade enzimática intrínseca e contribuem para a sinalização através de suas funções como adaptadoras [81], ambas compartilham homologia na porção N-terminal, em que dois domínios altamente conservados contribuem para o recrutamento do IRS até seus receptores [82,83]. A associação das proteínas IRS com seus receptores resulta na fosforilação do IRS em seus resíduos de tirosina na porção C-terminal, gerando sítios de ligação que recrutam proteínas efetoras

que participam da sinalização celular das vias JAK/STAT, PI3K/AKT, e MAPK [84–86].

O IRS2 é também ativado a partir da sua associação com receptores de três fatores de crescimento importantes para a hematopoese: receptor de eritropoetina (EPOR), trombopoetina (MPL) e IGF1 (IGF1R) [44,87–89]. O IRS1 pode ser ativado pelo receptor de IGF1, VEGF e GH [90–92]. No entanto, o papel das proteínas adaptadoras IRS na transdução de sinal dos seus receptores e na transformação neoplásica da célula hematopoética ainda são pouco explorados.

A EPO exerce seu efeito na hematopoese através do seu receptor transmembrana EPOR, que se associa a proteína JAK2 com consequente ativação de duas vias de sinalização distintas: (I) independente da fosforilação em tirosina do EPOR, via ERK [93], e (II) dependente da fosforilação em tirosina do EPOR, que gera sítios de ligação deste receptor com domínio SH2 e PTB de proteínas adaptadoras, com consequente ativação da via PI3K/AKT, e via STAT5 [90]. O IGF1 é um fator de crescimento que também atua na regulação da hematopoese. O receptor do IGF1 (IGF1R) é um receptor de proteínas tirosinoquinase tipo II e possui aproximadamente 70% de homologia com o receptor de insulina (IR). A atividade tirosinoquinase do IGF1R é induzida pela sua ligação com o IGF1, permitindo a ligação do receptor com substratos que contenham domínios SH2 ou PTB, incluindo o IRS1 e IRS2, e consequente ativação da via PI3K/AKT. O IGF1 participa da eritropoese, granulopoese e linfopoese normal e neoplásica [91]. A trombopoietina (TPO) é uma citocina endógena que promove o crescimento da CTH e é o principal regulador endógeno da produção de plaquetas. A TPO se liga ao seu receptor MPL, presente em megacariócitos e CTH [94]. TPO induziu a associação de IRS2 com MPL e ativação da via PI3K em células Ba/F3 expressando Mpl [92].

Estudos apontam que o IRS2 pode estar relacionado com a transformação oncogênica, encontrando-se diferencialmente expresso em diversos tipos de neoplasias [95,96]. Em trabalho recente, nosso grupo identificou a associação entre o substrato do receptor da insulina 2 (IRS2) e JAK2^{V617F}, mas não com JAK2 selvagem em modelos de linhagem leucêmica HEL e U937, respectivamente [97]. Em células HEL JAK2^{V617F}, o silenciamento de IRS2 potencializou o efeito do ruxolitinibe na modulação da via JAK/STAT, resultando na inibição de STAT5. A inibição de IRS2 também provocou diminuição da proliferação celular e aumento do número de células apoptóticas. No entanto, não houve modulação da via PI3K/AKT/mTOR [97]. A via de sinalização das

proteínas IRS1/2 e a cooperação do JAK2^{V617F} e IRS2 em NMP estão ilustradas na **Figura 3**.

Figura 3. Via de sinalização mediada pelas proteínas IRS1/2 e a cooperação entre JAK2^{V617F} e IRS2 em NMP. **Painel esquerdo:** Vias de sinalização de IRS1/2. As proteínas adaptadoras citoplasmáticas IRS1/2 são recrutadas e ativadas através da fosforilação em tirosina nos domínios PH/PTB. A associação das proteínas IRS com seus receptores que possuem atividade tirosinoquinase (receptor da insulina [IR], receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 [IGF1R]) resulta na fosforilação do IRS1/2 em seus resíduos de tirosina na porção C-terminal. Essa ativação gera sítios de ligação e recrutam proteínas efetoras que participam da sinalização celular das vias JAK/STAT, PI3K/AKT e MAPK (via canônica), regulando diversos processos biológicos, incluindo proliferação celular, síntese proteica, sobrevivência celular e expressão gênica em tecidos específicos. Em modelos murinos específicos, o IRS2 também pode interagir com JAK2 sob estímulo de angiotensina II ou leptina e ativar STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK. **Painel direito:** Em neoplasia mieloproliferativa (NMP) JAK2^{V617F}, IRS2 associa-se com JAK2^{V617F}, ativa STAT5, aumenta a proliferação, clonogenicidade e sobrevivência celular. A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>

Dados recentes de Osorio e colaboradores demonstraram que a desregulação da sinalização de IGF1 resulta na transformação maligna em NMP [98]. Em tumores sólidos, como câncer de mama, a inibição farmacológica de IGF1R resultou em efeitos antineoplásicos, sobretudo em células resistentes [99]. Desta forma, a identificação da associação da proteína IRS2 com JAK2^{V617F}, associada à descoberta da participação de IGF1 na patogênese das NMP sugere que IGF1R/IRS representa um potencial alvo de inibição para o tratamento das NMP JAK2 positivas.

1.7. Inibidor farmacológico de IRS1/2

Em 2013, Reuveni e colaboradores descreveram uma nova família de inibidores de IGF1R/IRS. Estes compostos foram desenhados para a degradação específica das proteínas IRS, resultando em uma alça de regulação negativa que inibe IGF1R de forma duradoura. Dentro dessa família, foram avaliadas as drogas NT52, NT75, NT157 e NT205. NT157 apresentou melhores resultados e teve seu mecanismo de ação esclarecido em células de melanoma [100].

Em células de melanoma, a proteína B-RAF encontra-se constitutivamente ativada, ativando a sinalização mediada por IGF1R, através do eixo IRS1/2-PKB, induzindo proliferação e sobrevivência [101]. Nessas células, NT157 se liga ao sítio alostérico de IGF1R e provoca alterações conformacionais que levam à dissociação de IRS1/2 do receptor. Essas proteínas migram para o citoplasma, onde recebem extensiva fosforilação em serina, sendo marcadas para degradação por proteassoma. Nesse modelo celular, a dissociação de IRS do receptor permite maior interação entre IGF1R e a proteína Shc, levando à ativação de C-RAF e aumento da sinalização de ERK [100]. Um modelo simplificado da ação do composto NT157 em células neoplásicas está ilustrado na **Figura 4**.

Reuveni e colaboradores demonstraram a eficácia do uso do NT157 na inibição de IRS1/2 em múltiplas linhagens de tumores sólidos, incluindo câncer de cólon, hepatocarcinoma, câncer de próstata, câncer de pulmão e sarcoma de Ewing. Em modelo celular de melanoma resistente ao tratamento padrão, NT157 levou a indução apoptótica e reduziu a resistência à droga PLX4032. *In vivo*, o composto resultou em diminuição do crescimento tumoral e de metástase [100].

Após a descoberta da droga, outros grupos de pesquisa avaliaram seus efeitos em neoplasias sólidas. Em câncer de próstata, tratamento com NT157 resultou em redução da proliferação, aumento da apoptose e parada do ciclo celular em G₂/M [102]. Em melanoma, a exposição ao NT157 resultou em inibição de STAT3, indicando que a droga apresenta mais de um alvo [103]. Esta inibição também foi reportada por Sanchez-Lopez e colaboradores, em modelo de câncer colorretal. Nesta neoplasia, o uso de NT157 também foi capaz de reduzir citocinas inflamatórias [104].

Em estudo anterior de nosso grupo, o tratamento com NT157 em células primárias de pacientes com NMP JAK2V617F resultou em redução da viabilidade

celular. Quando em combinação com ruxolitinibe, o tratamento com NT157 apresentou efeito cumulativo [97].

Figura 4. Modelo proposto para a ação de NT157 em células neoplásicas. (1) NT157 se liga a um sítio alostérico do receptor IGF1R provocando alterações conformacionais, levando à dissociação das proteínas IRS do receptor, permitindo que: (2) o receptor interaja mais fortemente com a proteína adaptadora Shc, levando a ativação de C-RAF e aumento na expressão de ERK; (3) As proteínas IRS citoplasmáticas recebem extensiva fosforilação em serina, sendo marcadas para degradação via proteassoma, sendo então degradadas, provocando a inibição de IRS1/2 de forma duradoura. (4) Alternativamente, NT157 inibe STAT3 de modo independente da inibição de IRS1/2, através da ativação de fosfatases. O modelo foi baseado na publicação de Reuveni e colaboradores e atualizado com base na publicação de Flashner-Abramson, que descreve a inibição de STAT3 após o tratamento com NT157 [100,103]. A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

1.8. Justificativa do trabalho

Tendo em vista a identificação da relevância da proteína IRS2 no fenótipo das células leucêmicas JAK2^{V617F} e a participação de IGF1 na patogênese das NMP, nosso trabalho tem como hipótese que IGF1R/IRS representa um alvo de inibição com grande

potencial para o tratamento das NMP JAK2^{V617F} positivas. Como estratégia de inibição, nós temos a oportunidade de utilizar um composto, NT157, desenhado especificamente para a degradação duradoura das proteínas IRS1/2, com consequente inibição da via de sinalização mediada por IGF1R.

Sustentando a escolha do inibidor farmacológico, temos os trabalhos em neoplasias sólidas, que apresentaram resultados deveras promissores. O fato de que todos os estudos foram realizados em tumores sólidos atua como um estímulo adicional para a avaliação em NMP. Este estudo abre caminhos para a descrição dos efeitos da droga em neoplasias hematológica, ampliando a compreensão dos efeitos e mecanismos de ação de NT157. Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa identificou a participação do IRS2 na via de sinalização JAK2^{V617F} e indicou o efeito antineoplásico de NT157 em células primárias de pacientes com NMP. No entanto, para a caracterização dos efeitos moleculares e celulares do NT157 se faz necessária a expansão do estudo em diferentes modelos de NMP JAK2^{V617F}.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos celulares e moleculares do tratamento com o inibidor de IRS1/2, NT157, isolado e em combinação com ruxolitinibe, em NMP JAK2^{V617F}.

2.2. Objetivos específicos

- Em modelos de linhagem leucêmica humana HEL JAK2^{V617F} e SET2 JAK2^{V617F}, avaliar:
  - O efeito do tratamento isolado com NT157 sobre a viabilidade, proliferação, apoptose, ciclo celular e clonogenicidade;
  - O efeito do tratamento isolado com NT157 na expressão e ativação de proteínas da via JAK2/STAT;
  - A modulação da expressão de genes envolvidos no processo neoplásico após exposição ao NT157;
  - O efeito da combinação de ruxolitinibe e NT157 sobre a viabilidade celular, apoptose e ciclo celular.
- Em células primárias de pacientes com PV, avaliar o efeito do tratamento com NT157 sobre a formação espontânea de colônias eritroides.
- *In vivo*, padronizar um modelo de camundongos xenotransplantados com linhagem celular humana HEL JAK2^{V617F} e avaliar os efeitos do tratamento com NT157 na carga tumoral e sobrevida.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens celulares humanas HEL 92.1.7 (HEL) e SET2. Ambas células representam modelos de leucemia secundária à NMP e expressam a mutação JAK2^{V617F} [105]. A linhagem celular HEL foi adquirida da ATCC (Philadelphia, PA, EUA) e as células SET2 foram gentilmente fornecidas pela Prof. Dr. Fabíola Attié de Castro (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo). A **Tabela 2** contém a descrição detalhada das linhagens celulares. As células foram autenticadas utilizando-se a técnica de *Short Tandem Repeat* (STR) e testadas para a presença de mycoplasma. O cultivo foi realizado em meio RPMI, acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina e enriquecido com 10% e 20% de soro bovino fetal, para a linhagem HEL e SET2, respectivamente. As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em estufa à 37°C com 5% de CO₂.

Tabela 2. Descrição das linhagens celulares utilizadas

Descrição	Linhagem	
	HEL 92.1.7	SET-2
Espécie	humana (Homo sapiens)	humana (Homo sapiens)
Tecido	medula óssea	sangue periférico
Tipo celular	eritroblastos	Linhagem megacariocítica
Origem/doença	Paciente do sexo masculino, caucasiano, com 30 anos portador de eritroleucemia	Paciente do sexo feminino, com 71 anos de idade portadora de trombocitemia essencial em transformação leucêmica.
Mutação JAK2^{V617F}	presente em homozigose	presente em heterozigose
Morfologia	linfoblastos	células individuais em suspensão, algumas células levemente aderentes e aproximadamente 1-3% de células gigantes
Nível de biossegurança	1	1
Característica da cultura	suspensão	suspensão
Referências	[105–107]	[105,108]

3.2. Inibidores farmacológicos e tratamento

O composto NT157 foi gentilmente cedido por Reuveni e colaboradores para a realização de testes iniciais e posteriormente adquirido da empresa Selleck Chemicals (Houston, Texas, USA). Ruxolitinibe foi obtido da InvivoGen (San Diego, CA, EUA). Para experimentos *in vitro*, as drogas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e a concentração do estoque foi de 10 mM para o NT157 e 20 mM para o ruxolitinibe. Para experimento *in vitro*, o NT157 foi diluído em 2-Hidroxipropil Beta-Ciclodextrina 20% (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, EUA). Um resumo do esquema de tratamento e das avaliações realizadas está ilustrado na **Figura 5**.

Ensaio <i>in vitro</i> : linhagens celulares			
Linhagens celulares	Droga e tratamento	Ensaio funcionais	Expressão gênica; expressão e ativação proteica
HEL JAK2 ^{V617F} SET2 JAK2 ^{V617F}	NT157: 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM 24, 48 e 72 horas *	Viabilidade celular (MTT) *	
	Exposição de longa duração	Apoptose (Anexina V/PI e clivagem de caspases) *	PCR array
	Ruxolutinibe 0,3 µM e/ou NT157 0,4 e 0,8 µM 48 horas	Proliferação celular (Ki67)	PCR em tempo real quantitativo
		Ciclo celular (iodeto de propídio)	Western blot
	Ruxolutinibe 0,3 µM e/ou NT157 1,6 e 3,2 µM 48 horas *	Clonogenicidade (formação de colônias)	

Figura 5. Organograma do esquema de tratamento e avaliações realizadas. O composto NT157 foi utilizado isolado (em diferentes concentrações por 24, 48 e 72 horas) e em combinação com ruxolitinibe (48 horas) em células HEL e SET2. Para o tratamento combinado, utilizou-se um esquema de combinação de doses diferentes para cada linhagem, de acordo com a sensibilidade das células ao composto. A célula HEL foi submetida a todos os ensaios indicados. O símbolo * indica as condições de tratamento e ensaios que foram estudados/validados para a células SET2.

3.3. Ensaio funcionais

3.3.1. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT). Para o tratamento, células HEL e SET2 foram submetidas à privação de soro bovino fetal (SBF) por quatro horas e após este período, 1×10^4

células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de NT157 em diferentes concentrações (Ø [DMSO]; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M). Adicionalmente, para a avaliação do tratamento combinado, células HEL foram tratadas ou não com ruxolitinibe 0,3 μ M e/ou NT157 0,4 μ M ou NT157 0,8 μ M e células SET2 foram expostas ou não ao ruxolitinibe 0,3 μ M e/ou NT157 1,6 μ M ou NT157 3,2 μ M. Após o período de tratamento (24, 48 e 72 horas), foram adicionados 10 μ L de uma solução de MTT (5mg/mL) aos poços e as placas foram incubadas à 37°C por 4 horas. Para interromper a reação, foram adicionados 100 μ L de 0,1N HCl em isopropanol. A avaliação da proliferação foi realizada pela mensuração da absorbância à 570nm por espectrofotometria. Os valores de IC₅₀ foram calculados por meio de regressão não linear, utilizando-se o programa CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO, EUA).

3.3.2. Avaliação de apoptose

A indução de apoptose foi verificada através da marcação com anexina V-APC e iodeto de propídio (PI) através de citometria de fluxo e confirmada pela avaliação da atividade das caspases por *Western blot*. Células HEL e SET2 foram cultivadas em placas de 24 poços, seguindo-se as mesmas condições de tratamento utilizadas para o ensaio de viabilidade celular. Após tratamento, as células foram lavadas com PBS gelado e ressuspensas em um tampão de ligação contendo 1 μ g/mL de PI e 1 μ g/mL de anexina V conjugada com APC. As amostras foram incubadas por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente e analisadas em equipamento FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA). Para cada amostra, foram adquiridos dez mil eventos. As análises foram realizadas com o programa FlowJo (Treestar, Inc., San Carlos, CA, EUA). Em paralelo, extrato total das células foram obtidos e submetidos a *Western blot* com anticorpos específicos para caspases 3, 8 e 9.

3.3.3. Avaliação da proliferação celular

A análise de proliferação celular foi realizada através da marcação para Ki-67. Células HEL foram tratadas com NT157 em diferentes concentrações (Ø; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) por 24 horas, fixadas com etanol 70% e armazenadas em freezer -20°C. O ensaio de marcação com o antígeno Ki-67 foi realizado de acordo com a orientação do fabricante (Ki-67 FITC clone B56; BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e a média da

intensidade de fluorescência foi obtida através do aparelho FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA). Isótopo IgG foi utilizado como controle negativo. As análises foram realizadas com o programa FlowJo (Treestar).

3.3.4. Análise do ciclo celular

O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo, utilizando-se marcação com PI (BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit; BD Bioscience) de acordo com orientações do fabricante. Células HEL foram submetidas a tratamento com NT157 em diferentes concentrações (Ø; 0,2; 0,4 e 0,8 µM) por 24 horas. As doses de 1,6 e 3,2 µM não foram utilizadas para a avaliação do ciclo celular, pois os experimentos iniciais revelaram um significativo número de células mortas nestas concentrações. A porcentagem de células em cada fase do ciclo foi adquirida por mensuração do conteúdo de DNA celular em aparelho FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA) e analisada através do programa FlowJo (Treestar).

3.3.5. Avaliação da clonogenicidade

Para avaliação da capacidade de formação de colônias em célula HEL, foram plaqueadas 1×10^3 células por poço em um volume de 500 µl de metilcelulose (MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada), na ausência ou presença de NT157 em diferentes concentrações (Ø; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM). Após 10 dias em cultura, adicionou-se MTT para marcar as colônias compostas por células viáveis, as colônias foram então, fotografadas e quantificadas através do programa de quantificação Image J. (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

3.4. Ensaios moleculares

3.4.1. Análise da expressão e ativação proteica por *Western blot*

Células HEL foram tratadas ou não com NT157 por 24 horas e submetidas a avaliação da expressão e ativação proteica. Após o tratamento, o precipitado celular

contendo 5×10^6 foi submetido a extração de proteína e quantificação. Para a extração, foi adicionado tampão contendo: Tris (100 mM, pH 7.6); Triton X-100 (1%); NaCl (150 mM); PMSF (35 mg/mL); Na_3VO_4 (10 mM); NaF (100 mM); $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (10 mM) e EDTA (4 mM). As amostras foram homogeneizadas e mantidas em gelo por 1 hora, e em seguida submetidas à centrifugação por 20 minutos a 4°C para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, foi adicionado tampão de Laemmli contendo ditiotreitol (100 mmol/L). Em seguida, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5-15% SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada por 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio. Após o bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio por 12 horas a 4°C e então lavadas três vezes com solução basal (10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, e 0.02% de Tween 20). Após este período, realizou-se incubação com anticorpos secundários e as membranas foram reveladas, utilizando-se o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e Gel Doc XR+ system (Bio-Rad). Os anticorpos utilizados estão listados na **Tabela 3**. A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão das proteínas endógenas, actina e α -tubulina, e a intensidade da fosforilação proteica, através da expressão da proteína total correspondente. As imagens finais foram elaboradas a partir das porções do gel que contêm as bandas de interesse.

Tabela 3. Anticorpos contra as proteínas de interesse, totais e fosforiladas, avaliadas por *Western blot*.

Empresa	Proteína alvo	Número de catálogo
Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	IRS-2	sc-390761
	STAT3	sc-7179
	STAT5	sc-835
	actina	sc-1616
	α -tubulina	sc-5286
Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	IRS-1	#3407P
	p-STAT3 ^{Y705}	#9131S
	p-STAT5 ^{Y694}	#9359S
	caspase 3	#9665
	caspase 8	#9746
	caspase 9	#9502
Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	p-ERK1/2 ^{T183/Y185}	700012
	ERK1/2	44654G

3.4.2. Avaliação do perfil de expressão gênica por PCR array

RNA total de células HEL tratadas ou não com NT157 0,8 μ M por 16 horas foi isolado utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific). Ao precipitado de células, contendo de 5×10^6 células, foi acrescentado 1mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA deu-se resumidamente com a adição de clorofórmio, que separa o RNA dos outros compostos orgânicos, seguida de centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa, que contém o RNA, foi transferida para um tubo novo, no qual foi adicionado isopropanol, uma solução que precipita o RNA. O precipitado de RNA foi então lavado com etanol 70% e armazenado no freezer -80°C. Para mensurar a quantidade e qualidade do RNA, alíquotas de 2 μ L de cada amostra foram submetidas à leitura da densidade ótica a 260nm (DO260) pelo espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Inglaterra). Apenas amostras apresentando razão A260/A280 entre 1.7 e 2.0 foram utilizadas. O DNA complementar (cDNA), foi sintetizado a partir de 1 μ g do RNA total, utilizando kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Thermo Fisher Scientific).

O *PCR array* foi realizado, adicionando-se o cDNA em placas comerciais específicas para a determinação do perfil de expressão de oncogenes e genes supressores tumorais (Human Oncogenes & Tumor Suppressor Genes RT² Profiler™ -

QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. As placas são constituídas por 96 poços, incluindo 12 controles de qualidade da reação e 84 genes de interesse. A amplificação das amostras foi realizada em equipamento ABI 7500 Sequence Detector System (Thermo Fisher Scientific). Os dados obtidos no PCR *array* foram analisados em uma plataforma online disponibilizada pela empresa que forneceu as placas. Os níveis de RNA mensageiro foram normalizados em relação aos níveis de expressão das amostras não tratadas e para a determinação dos genes modulados, adotou-se um *fold-change* de $\geq 1,5$ (50% para mais ou para menos).

3.4.3. Validação por PCR quantitativo

Para validar a modulação identificada pelo PCR *array*, realizou-se PCR em tempo real quantitativo para os principais genes alterados. Foram realizados cinco experimentos independentes, extração de RNA total e transcrição em cDNA. A amplificação gênica em tempo real foi realizada no aparelho ABI 7500 Sequence Detector System (Thermo Fisher Scientific) utilizando-se o reagente Power SybrGreen PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Para as reações, utilizou-se 60 ng de cDNA de cada amostra em triplicata. Como controle negativo para cada par de iniciador, utilizou-se água em lugar do cDNA. A expressão gênica de *HPRT1* e *ACTB* foi utilizada como controle endógeno das reações. A quantificação relativa das expressões de cada gene normalizado pelo controle endógeno foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [109]. Os iniciadores específicos para *CCND1*, *MYB*, *WT1*, *CDKN1A*, *JUN* e *FOS* e os controles endógenos *HPRT1* e *ACTB* estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Sequência dos iniciadores utilizados para validação do *PCR array*

Gene-alvo	Sequência de iniciadores (5' - 3')	Concentração (nM)
<i>Ciclina D1 (CCND1)</i>	FW: CTG GGT GTC CTA CAA ATG RV: AGC GGT CCA GGT AGT TCA T	300
<i>MYB</i>	FW: CTC CGC CTA CAG CTC AAC TCC RV: TCC TTT ATT CGC TTT TCC TTC TCA	150
<i>WT1</i>	FW: CGC TAT TCG CAA TCA GGG TTA RV: GGG CGT GTG ACC GTA GCT	300
<i>p21 (CDKN1A)</i>	FW: TGT CAC TGT CTT GTA CCC TTG T RV: GCC GGC GTT TGG AGT GGT AG	300
<i>JUN</i>	FW: CAG GTG GCA CAG CTT AAA CA RV: GTT TGC AAC TGC TGC GTT AG	150
<i>FOS</i>	FW: AGA ATC CGA AGG GAA AGG AA RV: CTT CTC CTT CAG CAG GTT GG	300
<i>HPRT1</i>	FW: GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG RV: TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT	150
<i>ACTB</i>	FW: AGG CCA ACC GCG AGA AG RV: ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A	300

3.5. Formação espontânea de colônias eritroides em células primárias

Amostras de sangue periférico ou medula óssea de três pacientes com PV, não tratados e ao diagnóstico, foram coletadas em EDTA e processadas imediatamente. As características clínicas dos pacientes avaliados estão descritas na **Tabela 5**. A utilização das amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O parecer de aprovação encontra-se no **ANEXO A**.

As amostras foram submetidas a separação por gradiente, utilizando Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) para a obtenção das mononucleares, seguida de lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. As células (2×10^5 células/poço) foram plaqueadas em meio semi-sólido methocult H4535 (suplementado com citocinas, exceto eritropoetina, StemCell Technologies), na ausência ou presença de NT157 na dose 3,2 μ M. Cada condição foi realizada em duplicata. As colônias eritroides foram

contadas após 14 dias de cultivo. Foram contabilizadas unidades formadoras de crescimento rápido-eritroide (BFU-E = *Burst-Forming Unit-Erythroid*) e unidades formadoras de colônia-eritroide (CFU-E = *Colony-Forming Unit-Erythroid*). Para ilustração, campos representativos de cada condição foram fotografados em estereomicroscópio Leica MZFLIII, acoplado a câmera Leica DFC 500, através do programa LAS V3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Tabela 5. Dados clínicos dos pacientes com policitemia vera (PV) avaliados no estudo

Característica clínica	Paciente		
	1	2	3
Sexo	M	F	M
Idade (anos)*	52	52	74
Hemoglobina (g/dL)*	19,7	17,2	19,2
Hematócrito (%)*	62,0	56,0	59,0
Leucócitos (x10⁹/L)*	8,5	15,8	9,1
Neutrófilos (x10⁹/L)*	5,2	12,5	7,2
Plaquetas (x10⁹/L)*	441	486	250
% de blastos na MO	0	2	0
BCR/ABL	negativo	negativo	negativo
Mutação JAK2V617F	negativo	positivo	positivo

Abreviações: NA: não avaliado; M: masculino, F: feminino, MO: medula óssea.

*Informações referentes a data da coleta da amostra utilizada no estudo.

3.6. Padronização de um modelo de camundongos xenotransplantados com linhagem celular humana HEL JAK2^{V617F}

3.6.1. Animais

Para a padronização do modelo murino, foram utilizados seis camundongos fêmeas NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ), com idade entre 11 e 12 semanas. Os animais foram fornecidos pelo *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, EUA) e mantidos no Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto. Durante os experimentos, os animais foram alojados em estantes ventiladas de pressão positiva, mantidos em grupos com quatro indivíduos em caixas com dimensões de 10x30 cm, forradas com maravalha. A limpeza das caixas foi realizada duas a três vezes por semana e o regime alimentar composto por água

autoclavada e ração à vontade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O parecer de aprovação (Protocolo CEUA 004/2016-1) encontra-se no **ANEXO B**.

3.6.2. Geração de células HEL expressando luciferase 2

O modelo de xenotransplante de células HEL^{V617F} em camundongos NOD/SCID foi previamente descrito por Kirabo e colaboradores, no entanto, relevantes alterações foram realizadas [110]. Neste trabalho, optou-se por transformar as células, incorporando o gene da luciferase 2 (Luc2), para possibilitar o acompanhamento da leucemogênese através da leitura da bioluminescência. O vetor lentiviral contendo o gene da luciferase 2 (pMSCV-Luc2-T2A-Puro) foi gentilmente cedido pelo Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza do Hemocentro de Ribeirão Preto [111].

Para a transdução, 2×10^5 células da linhagem HEL JAK2^{V617F} foram incubadas com 6 partículas infectantes por célula (multiplicidade de infecção [MOI] = 6) e polibreno por quatro horas, após 60 minutos de centrifugação a 800g. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 500 µl de meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%) e incubadas por um período de 48 horas em placa de 24 poços. Após 48 horas, deu-se início ao período de seleção das células transduzidas, através da adição de antibiótico puromicina (1 µg/ml) por 15 dias. Ao final da seleção, a bioluminescência das células HEL^{luc} foi avaliada *in vitro* por processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB). As células HEL^{luc} (1×10^7 por criotubo) foram criopreservadas em freezer -80°C. Todas as alíquotas descongeladas foram cultivadas sob meio seletivo e mantiveram a expressão de Luc2 após o descongelamento.

3.6.3. Processamento de imagem baseado em bioluminescência

A aquisição da bioluminescência foi realizada através do equipamento IVIS Lumina System (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA). Para a avaliação *in vitro*, foram utilizadas seis diferentes concentrações de células HEL^{luc} (1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 8×10^4 e 10×10^4). Aos poços contendo as células, adicionou-se enzima D-

luciferina (Perkin Elmer) a uma concentração final de 150 $\mu\text{g/mL}$. A captura das imagens foi realizada imediatamente após a adição da enzima.

Para avaliação *in vivo*, os animais receberam 150mg/kg de D-luciferina por injeção via intraperitoneal. Após aproximadamente 5 minutos, período de difusão da enzima, os camundongos receberam anestesia inalatória (2,5% de isoflurano em oxigênio) e foram posicionados no equipamento IVIS. Durante o período da captura das imagens, a sedação foi mantida por exposição constante ao isoflurano (1,5%).

O tempo de exposição variou de 10 segundos a 3 minutos, dependendo da intensidade do sinal. A intensidade da bioluminescência foi quantificada através da seleção manual da região que abrange o sinal, utilizando a ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*), disponibilizada pelo software utilizado para operar o equipamento (Living Image 3, Perkin Elmer). A intensidade é contabilizada como fluxo de fótons e expressa em fótons/s.

3.6.4. Xenotransplante

Células HEL^{luc} foram descongeladas 15 dias antes da realização do transplante e expandidas em meio RPMI, suplementado com 10% de SBF e puomicina (1 $\mu\text{g/ml}$) para manter a seleção e evitar a expansão de células não transduzidas. Para a indução da neoplasia sistêmica, 2×10^6 células foram ressuspendidas em 100 μL de PBS e implantadas nos camundongos por via endovenosa, através da veia caudal. Os camundongos foram pesados no dia do transplante, que foi considerado como D0. Nos dias D+7, D+14 e D+21, os animais foram novamente pesados e submetidos à avaliação da bioluminescência *in vivo* para acompanhar a leucemogênese. Os animais foram seguidos até o óbito ou apresentação de sinais de morbidade para análise de sobrevida. Morbidade foi definida por perda de 10% do volume corporal, presença de infecção, ulceração ou incapacidade de comer ou beber, conforme recomendado pelo “*Institutional Animal Care and Use Committee*” (National Institutes of Health, WA, EUA).

3.6.5. Experimento preliminar para tratamento com NT157 *in vivo*

Após a padronização, um novo grupo de camundongos NSG (n=10) recebeu a injeção de células HEL^{luc2} para indução da leucemia. Os animais foram acompanhados

através da avaliação da bioluminescência *in vivo*, nos dias D+3, D+7, D+14 e D+21. No dia D+3 os animais foram divididos em dois grupos para tratamento com NT157 (70 mg/kg) ou veículo (2-Hidroxipropil Beta-Ciclodextrina 20%, Sigma-Aldrich). A dose e frequência do tratamento foram baseadas nas três publicações que descreveram o tratamento com NT157 *in vivo* [100,102,103]. O tratamento foi realizado três vezes por semana, por injeção intraperitoneal até a data do sacrifício. Para a avaliação da sobrevida, os animais foram acompanhados até o óbito ou apresentação de sinais de morbidade. Após a eutanásia, o baço foi coletado para avaliação da esplenomegalia.

3.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Instat 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Os testes t de *Student* e ANOVA com pós-teste Bonferroni foram empregados, conforme apropriado. A sobrevida dos camundongos foi descrita através da curva de Kaplan Meier. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do tratamento isolado com inibidor de IRS1/2, NT157, em células JAK2^{V617F}

Na primeira etapa para a investigação dos efeitos do tratamento com NT157, avaliamos a viabilidade celular e apoptose em células HEL e SET2. As células foram tratadas ou não com NT157 em diferentes concentrações (Ø; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM) e expostas a 24, 48 e 72 horas de tratamento. A curva de doses da droga para os testes iniciais foram baseadas nas publicação de Reuveni e colaboradores, grupo que desenvolveu o composto e avaliou seus efeitos em tumores sólidos [100]. Ao menos três experimentos independentes foram realizados. Os resultados iniciais obtidos auxiliaram na escolha das doses e tempo de exposição à droga utilizados para as demais avaliações. Os demais ensaios (funcionais, expressão gênica, expressão/ativação proteica) foram realizados em linhagem celular HEL.

4.1.1. NT157 reduz a viabilidade celular e induz apoptose de modo dose e tempo dependente em células HEL JAK2^{V617F}

Inicialmente, para avaliar a eficácia da droga, calculamos os valores de IC₅₀, com base nos resultados da viabilidade celular, através do programa Calcsyn (Biosoft, Cambridge, Reino Unido). O programa fornece as representações gráficas de curva dose-resposta, fornecendo a distribuição das respostas às diferentes concentrações do composto avaliado; e a curva de efeito médio, que determina a dose necessária para que 50% das células estejam viáveis e 50% sofram morte após o tratamento. Em células HEL, os valores de IC₅₀ obtidos para os tratamentos de 24, 48 e 72 horas foram 3,1; 0,68 e 0,72 µM, respectivamente. As curvas utilizadas para definir o IC₅₀ e os valores obtidos encontram-se na **Figura 6**.

C

Tempo (h)	IC ₅₀ (uM)	r
24	3,12	0,97
48	0,68	0,98
72	0,72	0,97

Figura 6. Determinação do IC₅₀ para o tratamento com NT157 em linhagem celular HEL. (A) Curva dose-resposta, indicando o efeito do tratamento com NT157 em relação à concentração, as doses estão representadas no eixo X, enquanto os efeitos (morte celular) estão representados no eixo Y. **(B)** Curva do efeito médio do composto NT157, no eixo X encontram-se a fração de células mortas e no eixo Y, a projeção de doses. A dose média é representada pela concentração necessária para causar o efeito médio, ou seja, metade do efeito máximo. **(C)** Tabela dos valores de IC₅₀ para cada tempo de tratamento. Para o tratamento com NT157, foram encontrados os valores de 3,1 µM para 24 horas, 0,68 µM para 48 horas e 0,72 µM para 72 horas.

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de metabolização de MTT e a indução de apoptose, através de citometria de fluxo, utilizando anexina V conjugada com APC e PI. Ambos ensaios foram realizados após períodos de exposição ao NT157 de 24, 48 e 72 horas. Para cada condição, utilizou-se seis replicatas experimentais e quatro experimentos independentes para cada tempo de tratamento. Para avaliação da apoptose, optamos por não testarmos a concentração de 3,2 μM , visto que na dose de 1,6 μM , a fração de células apoptóticas já era superior a 60%.

Em células HEL JAK2^{V617F}, tratamento com NT157, em dose igual ou maior que 0,8 μM , reduziu a viabilidade celular de forma dose e tempo-dependente. O tratamento com o composto avaliado também induziu significativamente o aumento de células apoptóticas, em dose igual ou maior que 0,8 μM , em todos os tempos de tratamento (todos com $p < 0,001$). A porcentagem de células apoptóticas (anexina V positivas) identificadas para as condições controle, NT157 0,8 e 1,6 μM foi de 14, 56 e 68% para 24 horas de tratamento; 11, 60 e 68% para 48 horas; 6, 40 e 68% para 72 horas. Os resultados de viabilidade celular e apoptose estão representados graficamente e em *dot plot* na **Figura 7**.

4.1.2. NT157 aumenta a clivagem de caspases 3, 8 e 9

Para confirmar os resultados obtidos por citometria de fluxo, avaliamos através de *Western blot* a clivagem de caspases 3, 8 e 9 após 24 horas de exposição ao composto NT157 em diferentes concentrações. O tratamento com NT157 promoveu aumento da clivagem das caspases 3, 8 e 9, indicando a indução de apoptose em células HEL. A **Figura 8** é representativa de um dos experimentos de *Western blot*.

Figura 6. Tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular em células HEL JAK2^{V617F}. (A) A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, em células HEL tratadas ou não com NT157 em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) por 24, 48 e 72 horas. Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle, obtidas de quatro experimentos independentes (B) A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo em células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 μM) por 24, 48 e 72 horas, utilizando Anexina V/PI. Um *dot plot* ilustrativo é apresentado; os dois quadrantes da direita (quadrantes 2 e 3) contêm a população de células apoptóticas (Anexina+). (C) Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão de ao menos três experimentos independentes de apoptose. Os valores de *p* indicados nos gráficos correspondem a: ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ para células tratadas com NT157 vs. controle; teste ANOVA e pós teste Bonferroni.

Figura 7. Tratamento com NT157 provoca aumento nos níveis de caspases clivadas 3, 8 e 9. *Western blot* para análise dos níveis de caspases 3, 8 e 9 (total e clivada) em extratos proteicos de células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) por 24 horas; membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das respectivas proteínas totais e/ou fosforiladas e a actina, e reveladas com o reagente SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate e o sistema Gel Doc XR+.

4.1.3. Em linhagem celular SET2, NT157 reduz a viabilidade e induz apoptose nas doses mais altas

Para dar suporte aos resultados observados em linhagem celular HEL, expandimos os ensaios de viabilidade e apoptose para outra linhagem de NMP que apresenta a mutação $JAK2^{V617F}$ em heterozigose. As células SET2 representam uma linhagem megacariocítica proveniente de um paciente com trombocitemia essencial em transformação leucêmica. Para os testes, empregamos as mesmas condições e tempos de tratamento utilizadas para a linhagem HEL.

Para o tratamento com NT157 em células SET2, os valores IC_{50} foram de 9,4 μ M para 24 horas, 6,8 μ M para 48 horas e 6,4 μ M para 72 horas de tratamento. Considerando o valor do IC_{50} , a dose de 3,2 também foi utilizada para a avaliação de apoptose. A viabilidade celular foi significativamente reduzida somente na dose de 3,2 μ M para todos os tempos de exposição à droga ($p \leq 0,05$). NT157 induziu significativamente o aumento de células apoptóticas nas doses de 1,6 e 3,2 μ M

($p < 0,001$). A porcentagem de células apoptóticas (anexina V positivas) identificadas para as condições controle, NT157 1,6 e 3,2 μM foi de 12, 35 e 39% para 24 horas de tratamento; 11, 36 e 42% para 48 horas; 22, 28 e 54% para 72 horas. Os resultados de viabilidade celular e apoptose estão representados graficamente na **Figura 9**.

4.1.4. NT157 reduz a proliferação celular em células HEL JAK2^{V617F}

Para dar seguimento à avaliação dos efeitos celulares do tratamento com NT157, realizamos a análise da proliferação celular através da marcação para o antígeno Ki-67 em células HEL tratadas por 24 horas. O tratamento com NT157 reduziu a proliferação celular a partir da dose de 0,8 μM (**Figura 10**). A quantidade de células em proliferação reduziu em 43, 58 e 62% nas doses de 0,8; 1,6 e 3,2 μM , respectivamente ($p < 0,0001$).

Células SET2

Figura 8. Tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular em células SET2^{V617F} e induz apoptose nas doses mais altas. (A) A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, em células SET2 tratadas ou não com NT157 em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) por 24, 48 e 72 horas. Os gráficos em barra representam a média ± desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle, obtidas de quatro experimentos independentes. **(B)** A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo em células SET2 tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8, 1,6 e 3,2 μM) por 24, 48 e 72 horas, utilizando Anexina V/PI. Um *dot plot* ilustrativo é apresentado; os dois quadrantes da direita (quadrantes 2 e 3) contêm a população de células apoptóticas (Anexina+). **(C)** Os gráficos em barra representam a média ± desvio padrão de ao menos três experimentos independentes de apoptose. Os valores de *p* indicados nos gráficos correspondem a: *p<0,05, ***p<0,0001 para células tratadas com NT157 vs. controle; teste ANOVA e pós teste Bonferroni.

Figura 9. Tratamento com NT157 reduz a proliferação celular em HEL JAK2^{V617F}. A proliferação celular é quantificada a partir da intensidade de fluorescência (MIF) da marcação com anti-Ki-67-FITC (A) Histogramas representativos de um experimento contendo a MIF da marcação com anti-Ki-67 após 24 horas de exposição ao NT157. (B) Histogramas com os picos das MIF de Ki-67 para todas as condições avaliadas; após 24 horas de exposição ao NT157, cada condição está representada em uma cor e pode ser verificada na legenda no painel esquerdo. (C) O gráfico em barra representa a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes após 24 horas de tratamento. Os valores de p indicados nos gráficos correspondem a: ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ para células tratadas com NT157 vs. controle; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.1.5. Exposição prolongada ao composto NT157 reduz a formação de colônias

Para a avaliação da capacidade de formação de colônias após exposição de longa duração ao composto NT157, células HEL foram cultivadas por 10 dias em metilcelulose, na ausência ou presença da droga em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M). Através da adição de MTT, foi possível quantificar o número de colônias compostas por células viáveis. A exposição prolongada ao NT157 reduziu a

formação de colônias, em 38% e 36% nas doses de 1,6 e 3,2 μM , respectivamente ($p \leq 0,05$). Uma imagem representativa de um dos experimentos, bem como a representação gráfica e estatística das replicatas, podem ser visualizadas na **Figura 11**.

Figura 10. Exposição de longo prazo ao composto NT157 reduz a formação de colônias em células HEL JAK2^{V617F}. Colônias contendo células viáveis foram detectadas por MTT após 10 dias de cultura. Células HEL foram tratadas com NT157 em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) e normalizadas em relação às células não tratadas. As imagens das colônias são representativas de um experimento e o gráfico em barras apresenta a média $\pm$ desvio padrão de cinco experimentos independentes; os valores de p encontram-se indicados no gráfico; * $p < 0,05$; teste ANOVA e pós teste Bonferroni.

4.1.6. Tratamento com NT157 induz parada do ciclo celular em G₂, associada com redução da população G₀/G₁

Para verificar os efeitos do tratamento com NT157 na progressão do ciclo celular, células HEL foram submetidas a tratamento com NT157 nas concentrações inferiores ou próximas ao IC₅₀ (0,2; 0,4 e 0,8 μM). As doses de 1,6 e 3,2 μM não foram utilizadas para a avaliação do ciclo celular, pois os experimentos de viabilidade celular e apoptose revelaram um significativo número de células mortas nestas concentrações, o que poderia interferir na marcação com iodeto de propídeo. A avaliação foi realizada após 24 horas de tratamento, visto que alterações no ciclo celular antecedem os eventos celulares já avaliados, não sendo ideal avaliar períodos mais tardios.

Em linhagem celular HEL, a exposição ao composto NT157 provocou aumento da população em G₂/M ($p<0,001$), associado a uma redução da população em G₀/G₁ ($p<0,001$), sugerindo uma parada no ciclo celular em G₂, que corresponde ao ponto de checagem para dano de DNA (**Figura 12**). A população de células na fase S não sofre alteração após tratamento com NT157.

Figura 11. NT157 induz aumento da população em G₂/M associado à redução de células em G₀/G₁. (A) A progressão do ciclo celular foi determinada pelo kit BD Cycletest™ Plus DNA Reagent em células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2, 0,4 e 0,8 µM) por 24 horas. Um histograma representativo para cada condição é ilustrado; a fase do ciclo celular é definida de acordo com a quantidade de DNA: azul (células em G₀/G₁), verde (células na fase S) e vermelho (G₂/M). (B) O gráfico em barra representa a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células em G₀/G₁, S e G₂/M após tratamento com NT157 por 24 horas. Os valores de p encontram-se indicados no gráfico; ** $p<0,001$, *** $p<0,0001$ para as amostras tratadas com NT157 vs. células não tratadas; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.1.7. Análise da expressão proteica confirma que o composto NT157 inibiu as proteínas IRS1 e IRS2 em linhagem celular HEL JAK2^{V617F}

Para confirmar o efeito do inibidor NT157 sobre as proteínas IRS1 e IRS2, células HEL foram tratadas ou não com NT157 em diferentes concentrações (Ø; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 µM). As amostras foram coletadas após 24 horas e o extrato proteico foi submetido a avaliação por *Western blot*. Como esperado, o tratamento com NT157 promoveu redução nos níveis totais de IRS1 e IRS2 de modo dose-dependente. A

Figura 13 contém um *blot* representativo de um dos experimentos realizados para a avaliação das proteínas IRS.

Figura 12. Tratamento com NT157 reduziu os níveis de proteínas IRS1 e IRS2. *Western blot* para análise dos níveis de IRS1 e IRS2 em extratos totais de células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) por 24 horas; as membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das proteínas de interesse e da α-tubulina, utilizada como controle endógeno; a revelação foi realizada com o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, em aparelho Gel Doc XR+. *Blot* representativo de um dos três experimentos independentes realizados para a detecção dos níveis de expressão de expressão de IRS1 e IRS2.

4.1.8. NT157 modula a via de sinalização JAK2/STAT em células HEL JAK2^{V617F}

Para caracterizar os efeitos do tratamento com NT157 na expressão e ativação das proteínas da via JAK/STAT, células HEL foram tratadas ou não com NT157 em diferentes concentrações (Ø; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 μM) por 24 horas. Nesta etapa, avaliamos a expressão e ativação das proteínas STAT3, STAT5 e ERK, totais e fosforiladas. A exposição ao composto NT157 provocou redução na fosforilação de STAT3, STAT5 e ERK de modo dose-dependente, de forma que concentrações igual ou superior a 0,8 μM foram suficientes para abolir completamente a fosforilação de STAT3. Os *blots* das proteínas avaliadas podem ser observados na **Figura 14**.

Células HEL

Figura 13. Exposição ao composto NT157 inibe a fosforilação de STAT3, STAT5 e ERK1/2 de modo dose-dependente em células HEL. *Western blot* para análise dos níveis de p-STAT3, STAT3, p-ERK1/2, ERK1/2, p-STAT5 e STAT5 em extratos totais de células HEL tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) por 24 horas; as membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das proteínas de interesse e da actina, utilizada como controle; a revelação foi realizada com o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, em aparelho Gel Doc XR+. *Blot* representativo de um dos três experimentos independentes realizados para a detecção dos níveis de expressão e ativação de STAT3, STAT5 e ERK.

4.1.9. NT157 reduz a expressão de oncogenes e aumenta a expressão de genes envolvidos na indução apoptótica

Para investigar os efeitos moleculares do tratamento com NT157 e compreender melhor os resultados obtidos nos ensaios funcionais, nosso próximo passo foi realizar

um *PCR array* para oncogenes e supressores tumorais humanos. Este experimento permitiu a análise do perfil de expressão gênica de 84 genes-chave no desenvolvimento e progressão de neoplasias, incluindo oncogenes, supressores tumorais, genes com ambas propriedades e genes envolvidos em processos celulares essenciais, como proliferação, progressão do ciclo celular e apoptose. Foram analisadas amostras de células HEL não tratadas e tratadas por 16 horas com NT157 na concentração de 0,8 μ M, provenientes de dois experimentos independentes.

O tratamento com NT157 modulou a expressão de 23 oncogenes e genes supressores tumorais. Estes genes encontram-se listados no *heat map* ilustrativo apresentado na **Figura 15A**. Os dados obtidos no *PCR array* foram analisados e para a determinação dos genes modulados adotou-se um *fold-change* de 1,5 (50% para mais ou para menos). Baseados nos resultados dos experimentos prévios e na descrição destes genes em neoplasias hematológicas, selecionamos seis genes para validar em um número maior de experimentos (n=5). Foram selecionados os genes *CCND1*, *MYB*, *WT1*, *CDKN1A*, *JUN* e *FOS*. A validação foi realizada através de PCR em tempo real quantitativo, avaliando-se as mudanças nos níveis de RNA mensageiro. A modulação dos genes selecionados foi confirmada, sendo identificados três oncogenes regulados negativamente após tratamento com NT157, incluindo *CCND1*, *MYB* e *WT1*. O gene *CDKN1A*, envolvido com o controle do ciclo celular e os genes *JUN* e *FOS* apresentaram aumento da expressão gênica após exposição ao NT157. Os gráficos com a validação da expressão dos genes selecionados são apresentados na **Figura 15B**. A lista com todos os genes avaliados e suas expressões relativas encontra-se na Tabela Suplementar 1 (**APÊNDICE A**).

Figura 14. NT157 modulou a expressão de 23 oncogenes e genes supressores tumorais em células HEL JAK2^{V617F}. (A) *Heat map* ilustrativo, contendo os dados do PCR *array* (expressão gênica) para células tratadas ou não com NT157 (0,8 μM). Para as células HEL não tratadas, os níveis de RNAm são expressos como *fold change* = 1 e os genes que apresentaram *fold change* ≥ 1.5 depois do tratamento com NT157 foram apresentados no *heat map*. Foram utilizados dois experimentos independentes para cada condição; cor verde indica níveis reduzidos de RNAm e vermelho, aumento nos níveis de expressão. (B) Validação de seis genes envolvidos na progressão do ciclo celular e apoptose em um número maior de experimentos (n=5). Os valores de *p* encontram-se indicados nos gráficos; *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001; Teste t de Student.

4.2. Efeitos do tratamento combinado de ruxolitínibe e NT157 em células JAK2^{V617F}

Como estratégia de inibição de JAK2 e IRS1/2, realizamos a combinação de ruxolitínibe com NT157. O primeiro passo para a definição do tratamento foi o estabelecimento das doses de ambas as drogas. Para NT157, optamos por utilizar as

concentrações mais próximas ao IC_{50} e que não provocaram excessiva morte celular (0,4 e 0,8 μ M para linhagem celular HEL e 1,6 e 3,2 para SET2). Para definir as doses de ruxolitinibe, partimos de doses descritas na literatura e utilizadas em trabalhos anteriores de nosso grupo e avaliamos uma curva de diluições através de um experimento de *Western blot*, em que se verificou os efeitos das diferentes concentrações de ruxolitinibe sobre a ativação das proteínas STAT (STAT3 e STAT5). A fosforilação de STAT3 e STAT5 foi inibida de forma dose-dependente após tratamento com ruxolitinibe e a partir da concentração de 0,3 μ M, observou-se inibição total da fosforilação de ambas proteínas (**Figura 16**), indicando inibição das proteínas. Dessa forma, optamos por utilizar a dose de 0,3 μ M para o tratamento combinado com NT157, resultando em seis condições diferentes para cada célula (**Tabela 6**).

Tabela 6. Condições do tratamento combinado para cada linhagem celular

Linhagem celular	Droga (μ M)	
	Ruxolitinibe	NT157
HEL	-	-
	0,3	-
	-	0,4
	-	0,8
	0,3	0,4
	0,3	0,8
SET2	-	-
	0,3	-
	-	1,6
	-	3,2
	0,3	1,6
	0,3	3,2

Figura 15. Ruxolitinibe 0,3 μM inibe a fosforilação das proteínas STAT3 e STAT5 em células HEL. Blot representativo de um dos experimentos independentes de *Western blot* para a avaliação dos efeitos das diferentes concentrações de ruxolitinibe sobre a ativação das proteínas STAT em extratos totais de células HEL tratadas ou não com ruxolitinibe (0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1 μM) por 24 horas; as membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das proteínas de interesse e da actina, utilizada como controle; a revelação foi realizada com o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, em aparelho Gel Doc XR.

4.2.1. Em linhagem celular HEL JAK2^{V617F}, ruxolitinibe não potencializou os efeitos do tratamento com NT157

Com base nos resultados obtidos com NT157 isolado, optou-se por realizar os ensaios funcionais após 48 horas de exposição às drogas. A viabilidade celular foi analisada através de MTT, seguindo as mesmas condições descritas para o tratamento isolado com NT157. Para cada condição, utilizou-se seis replicatas experimentais e seis experimentos independentes. Em linhagem celular HEL, todas as condições testadas (**Tabela 6**) apresentaram redução da viabilidade celular quando comparadas ao controle

não tratado ($p<0,05$). O tratamento combinado nas doses de ruxolitinibe 0,3 μM e NT157 0,4 μM , reduziu a viabilidade quando comparado à monoterapia com NT157 0,4 μM ($p<0.001$), no entanto, esse efeito foi equivalente ao causado pela monoterapia com ruxolitinibe. Para a segunda condição (ruxolitinibe 0,3 μM e NT157 0,8 μM), a redução da viabilidade celular foi significativamente maior quando comparada com a monoterapia com ruxolitinibe ($p<0,0001$), sendo semelhante ao efeito produzido pelo tratamento isolado com NT157 0,8 μM . Dessa forma, os resultados sugerem que em células HEL^{JAK2}, ambas as drogas são efetivas, sendo NT157 0,8 μM mais eficaz que o ruxolitinibe 0,3 μM na redução da viabilidade ($p<0,0001$), não havendo efeito potencializador com o uso das drogas combinadas (**Figura 17A**).

Não foi observado aumento significativo no número de células apoptóticas após tratamento isolado com ruxolitinibe ou NT 0,4 μM quando comparadas ao controle não tratado. Monoterapia com NT157 0,8 μM provocou aumento significativo na apoptose quando comparado ao controle e a combinação das drogas (ruxolitinibe 0,3 μM e NT157 0,8 μM) ($p<0,05$) (**Figura 17B-C**).

Figura 16. Em linhagem celular HEL JAK2^{V617F}, ruxolitinibe não potencializou os efeitos do tratamento com NT157 na redução da viabilidade. (A) A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, em células HEL tratadas ou não em diferentes condições (ruxolitinibe [Rx] 0,3; NT157 0,4; NT157 0,8; ruxolitinibe + NT157 0,4; ruxolitinibe + NT157 0,8 μ M) por 48 horas. Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle, obtidas de seis experimentos independentes. (B) A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo em células HEL tratadas ou não em diferentes condições (ruxolitinibe 0,3; NT157 0,4; NT157 0,8; ruxolitinibe + NT157 0,4; ruxolitinibe + NT157 0,8 μ M) por 48 horas, utilizando anexina V/PI. Um dot plot representativo é apresentado; os dois quadrantes da direita (quadrantes 2 e 3) contêm a população de células apoptóticas (anexina+). (C) O gráfico em barra representa a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes de apoptose. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação à monoterapia com ruxolitinibe, † $p < 0,05$ em relação à monoterapia com NT157; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.2.2. Em linhagem celular SET2 JAK2^{V617F}, ruxolitinibe não potencializou os efeitos do tratamento com NT157

Em linhagem celular SET2, todas as condições de tratamento (**Tabela 6**) apresentaram redução na viabilidade celular quando comparadas ao controle não tratado (todas com $p < 0,001$) (**Figura 18A**). Quando se avaliou o efeito das drogas isoladamente na viabilidade celular, ruxolitinibe apresentou maior efeito na redução da viabilidade celular em comparação com o NT157 (54 % de células viáveis para ruxolitinibe *versus* 85 e 70% para NT157 1,6 e 3,2 μM ; $p < 0,001$), sendo que o efeito observado nas doses combinadas foi semelhante ao provocado por ruxolitinibe (52 e 48% de células viáveis para ruxolitinibe 0,3 μM + NT157 1,6 μM ; e ruxolitinibe 0,3 μM + NT157 3,2 μM , respectivamente).

Na avaliação da apoptose, observamos que a combinação das drogas aumentou o número de células apoptóticas em relação à monoterapia com ruxolitinibe ($p < 0,0001$), e o efeito observado é semelhante ao induzido pelo NT157 isoladamente (**Figura 18B-C**).

SET2

Figura 17. Em linhagem celular SET2 JAK2^{V617F}, ruxolitinibe não potencializou os efeitos do tratamento com NT157 na redução da viabilidade. (A) A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, em células SET2 tratadas ou não em diferentes condições (ruxolitinibe [Rx] 0,3; NT157 1,6; NT157 3,2; ruxolitinibe + NT157 1,6; ruxolitinibe + NT157 3,2 μ M) por 48 horas. Os gráficos em barra representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle, obtidas de seis experimentos independentes. (B) A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo em células SET2 tratadas ou não em diferentes condições (ruxolitinibe 0,3; NT157 1,6; NT157 3,2; ruxolitinibe + NT157 1,6; ruxolitinibe + NT157 3,2 μ M) por 48 horas, utilizando anexina V/PI. Um dot plot representativo é apresentado; os dois quadrantes da direita (quadrantes 2 e 3) contêm a população de células apoptóticas (anexina+). (C) O gráfico em barra representa a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes de apoptose. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação à monoterapia com ruxolitinibe, † $p < 0,05$ em relação à monoterapia com NT157; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.2.3. Em linhagem celular HEL JAK2^{V617F}, ruxolitinibe reduz a parada em G₂/M induzida por NT157

Ruxolitinibe 0,3 μ M não provocou alteração significativa na progressão do ciclo celular quando comparado ao controle não tratado. O composto NT157 nas concentrações de 0,4 e 0,8 μ M, comparado ao controle não tratado, provocou acúmulo em G₂/M ($p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente), associado com redução da população em G₀/G₁ ($p < 0,0001$ para ambas as doses) como observado nos experimentos anteriores. Nas condições de combinação, ruxolitinibe preveniu o efeito do composto NT157, provocando redução do acúmulo de células em G₂/M quando comparado com a monoterapia com NT157 ($p < 0,05$) (**Figura 19**).

Esses achados sugerem que o ruxolitinibe pode estar modulando a atividade citotóxica do NT157, uma vez que a parada em G₂/M é um indicativo de citotoxicidade, pois corresponde ao ponto de checagem ao dano de DNA.

HEL

A

B

Figura 18. Em linhagem celular HEL JAK2^{V617F}, ruxolitinibe reduz a parada em G₂/M induzida por NT157. (A) A progressão do ciclo celular foi determinada pelo BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit em células HEL tratadas ou não (Ø; Ruxo 0,3; NT 0,4; NT 0,8; Ruxo 0,3 + NT 0,4; Ruxo 0,3 + NT 0,8 µM) por 24 horas. Um histograma representativo para cada condição é ilustrado; a fase do ciclo celular é definida de acordo com a quantidade de DNA: azul (células em G₀/G₁), verde (células na fase S) e vermelho (G₂/M). (B) Os gráficos em barra representam a média ± desvio padrão da porcentagem de células em G₀/G₁, S e G₂/M após tratamento. *p < 0,05 em relação ao controle, # *p* < 0,05 em relação à monoterapia com ruxolitinibe, † *p* < 0,05 em relação à monoterapia com NT157; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.3. NT157 inibe a formação de colônias eritroides independente de eritropoetina em células primárias de pacientes com PV

Células primárias de pacientes com PV apresentam a capacidade de formação espontânea de colônias eritróides em metilcelulose, mesmo na ausência de EPO [112]. Para verificar os efeitos do NT157 isolado ou combinado com ruxolitinibe sobre este processo anormal de proliferação, nós realizamos ensaios de formação espontânea de colônias eritroides em amostras primárias de pacientes diagnosticados com PV (n=3). Como controle, utilizamos o ruxolitinibe 0,5 μ M, dose capaz de inibir a formação de colônias eritroides. Exposição ao NT157 3,2 μ M reduziu a formação espontânea de colônias eritroides em todas as amostras testadas, com diminuição de 49 % (paciente #1), 12% (paciente #2) e 23% (paciente #3) (**Figura 20A**). A média de redução para os três pacientes foi de 29% (**Figura 20B**). Imagens representativas de cada condição estão ilustradas na **Figura 20C**.

Figura 19. NT157 reduz a formação espontânea de colônias eritroides em células primárias de pacientes com policitemia vera (PV). (A) Células mononucleares de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com PV ao diagnóstico, foram cultivadas em metilcelulose, suplementada com citocinas, exceto EPO e na ausência ou presença de NT157 e/ou ruxolitinibe. (A) Gráficos em barra com média±desvio das duplicatas para cada paciente avaliado. (B) Dot plot comparando os resultados obtidos para todas as amostras de pacientes avaliadas (n=3); as linhas horizontais representam a média±desvio padrão. Os valores de p indicados nos gráficos correspondem a: * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ para células tratadas vs. controle; teste ANOVA e pós teste Bonferroni. (C) Imagens representativas de cada condição de tratamento para uma das amostras avaliadas. As fotos foram obtidas em estereomicroscópio Leica MZFLIII, acoplado a câmera Leica DFC 500, através do programa LAS V3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.4. Padronização de um modelo de camundongos xenotransplantados com linhagem celular humana HEL JAK2^{V617F}

4.4.1. Confirmação da transformação das células HEL através da atividade biológica da luciferase

Ao final da transdução, realizamos a avaliação *in vitro* da atividade biológica da luciferase em células HEL transformadas. Para esta avaliação, foram utilizadas seis concentrações de células HEL^{luc} (1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 8×10^4 e 10×10^4). O processamento de imagem baseado em bioluminescência confirmou que as células HEL passaram a expressar luciferase biologicamente ativa, indicando o sucesso da transformação (**Figura 21**).

Figura 20. Bioluminescência *in vitro* das células HEL transformadas para expressar luciferase. Atividade biológica da luciferase em diferentes concentrações de células HEL^{luc}. A intensidade de bioluminescência é medida em fótons por segundo. O sinal da bioluminescência é diretamente proporcional ao número de células HEL que expressam luciferase biologicamente ativa após transformação por lentivírus. A aquisição do sinal de bioluminescência foi realizada através do sistema IVIS Lumina.

4.4.2. Acompanhamento da leucemogênese e avaliação da sobrevida

Para a realização do xenotransplante, seis animais receberam injeção de 2×10^6 células HEL^{luc}. O dia do transplante foi definido como dia D0. O processamento de imagem baseado em bioluminescência *in vivo*, para acompanhar a leucemogênese, foi realizado nos dias D+7, D+14 e D+21. As análises demonstraram que as células HEL sobreviveram após o transplante e colonizaram o animal, confirmando a indução da neoplasia sistêmica. O sinal da bioluminescência, que é equivalente ao número de células expressando luciferase, aumentou a cada aquisição em todos os animais, evidenciando a progressão da doença (**Figura 22**). A sobrevida dos animais foi homogênea, havendo morte após 25 (n=1) e 26 (n=5) dias do xenotransplante (**Figura 23**).

Figura 21. Rastreamento das células HEL^{luc} xenotransplantadas em camundongos NSG. (A) Células HEL^{luc} foram transplantadas em camundongos NSG (n=6). Detecção da bioluminescência *in vivo* para um dos animais ao longo da progressão da doença nos dias D+7, D+14 e D+21. O sinal emitido indica que as células sobreviveram e povoaram a medula óssea dos camundongos receptores. (B) Quantificação da bioluminescência emitida pelas células HEL^{luc} nos dias D+7, D+14 e D+21. A intensidade de bioluminescência é medida em fótons por segundo e está expressa em Log¹⁰. O sinal da bioluminescência é diretamente proporcional ao número de células HEL que expressam luciferase biologicamente ativa. A aquisição das imagens foi realizada em sistema IVIS Lumina.

Figura 22. Curva de sobrevida dos camundongos NSG xenotransplantados. O eixo x representa o dia pós transplante e o eixo y, a porcentagem de sobrevivência. Todos os animais (n=6) morreram entre o 25° e 26° dias após receberem as células. A sobrevida dos camundongos foi descrita através da curva de Kaplan Meier.

4.4.3. Tratamento com NT157 em camundongos NSG xenotransplantados

Após a padronização do modelo, tivemos a oportunidade de adquirir o composto NT157 em quantidade suficiente para a realização de experimentos *in vivo*. Dessa forma, realizamos um tratamento inicial com NT157 no modelo estabelecido. Para tal, 10 animais receberam 2×10^6 células HEL^{luc} , como descrito no tópico da padronização. A avaliação da bioluminescência *in vivo* para acompanhamento da leucemogênese foi realizada nos dias D+3, D+7, D+14 e D+21 após o transplante. No dia D+3, os animais foram separados em dois grupos e começaram a receber NT157 (n=5) ou veículo (n=5). No dia D+7, um dos animais do grupo tratado foi excluído e sacrificado, devido à formação de um tumor local na área da injeção das células.

As análises demonstraram que as células sobreviveram ao transplante e colonizaram os animais, induzindo a neoplasia sistêmica. O tratamento com NT157 não alterou o número de células neoplásicas, sendo que os dois grupos apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento da doença e aumento das células (**Figura 24A**). O tratamento com NT157 também não resultou em aumento da sobrevida, sendo que todos os animais morreram de forma homogênea, entre os dias 24 e 27 após o transplante

(Figura 23B). Os dados de peso corpóreo e do peso do baço, na data do sacrifício foram semelhantes entre os animais tratados com NT157 e veículo (Figuras 24C e D).

Figura 23. Tratamento com NT157 em camundongos NSG xenotransplantados. (A) Rastreamento das células HEL^{luc} xenotransplantadas em camundongos NSG. As Células HEL^{luc} foram transplantadas em camundongos NSG (n=10). Quantificação da bioluminescência emitida pelas células HEL^{luc} nos dias D+3, D+7, D+14 e D+21 para os animais tratados com veículo (n=5) e NT157 (n=4). A intensidade de bioluminescência foi medida em fótons por segundo e está expressa em Log¹⁰. O sinal da bioluminescência é diretamente proporcional ao número de células HEL que expressam luciferase biologicamente ativa. A aquisição das imagens foi realizada em sistema IVIS Lumina. (B) Curva de sobrevida dos camundongos NSG xenotransplantados. O eixo x representa o dia pós transplante e o eixo y, a porcentagem de sobrevivência. Três animais de cada grupo morreram no 24º e os demais, no 27º dia após receberem as células. A sobrevida dos camundongos foi descrita através da curva de Kaplan Meier. (C) Tabela com os dados de peso corpóreo (gramas) e do baço de cada um dos animais no dia da realização do sacrifício. (D) Imagem representativa dos baços de três animais de cada grupo.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo tem como uma das principais hipóteses a cooperação entre a proteína JAK2^{V617F} e o IRS2 na indução da transformação maligna em NMP. Foi demonstrado em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa que a proteína IRS2 associa-se com JAK2 mutado, mas não com a proteína selvagem e que, em células HEL JAK2^{V617F}, a inibição do IRS2 através de lentivírus potencializou o efeito do ruxolitinibe na redução da proliferação celular e na indução da apoptose [97]. Adicionalmente, trabalhos recentes têm demonstrado que a desregulação da via de sinalização de IGF1R está relacionada à patogênese das NMP e de outras neoplasias [98,113]. Esses dados articulados apontam para a direção de um novo alvo terapêutico em NMP JAK2^{V617F}. Como estratégia de inibição de IGF1R/IRS nós optamos por utilizar o composto NT157, desenvolvido para a inibição desta via, através da degradação proteossômica das proteínas IRS1/2 [100].

A definição do modelo de estudo consiste em uma importante etapa do trabalho. Como explorado anteriormente, a mutação JAK2^{V617F} corresponde à principal lesão molecular em todas as categorias das NMP clássicas [32,46,48]. Tendo conhecimento da associação entre IRS2 e JAK2^{V617F}, os modelos celulares escolhidos HEL e SET2 expressam a mutação JAK2^{V617F} em homozigose e heterozigose, respectivamente, e são provenientes de pacientes que apresentaram evolução leucêmica [105].

Em células JAK2^{V617F}, o tratamento com NT157 resultou em efeitos antineoplásicos notáveis, provocando redução da viabilidade, indução de apoptose, redução da proliferação celular e formação de colônias. Até o presente momento, não há estudos publicados acerca dos efeitos do tratamento com NT157 em neoplasias hematológicas, o que torna os resultados obtidos inéditos e relevantes para a caracterização da ação desse composto em neoplasias hematológica. Os trabalhos que descreveram o mecanismo de ação da droga e as publicações mais recentes concentraram-se em tumores sólidos, como câncer de próstata, melanoma, câncer colorretal e osteossarcoma. Nesses modelos, o tratamento com NT157 promoveu redução do tamanho tumoral, aumento da apoptose e redução da inflamação *in vitro* e *in vivo* [100,102–104,114].

A expressão da mutação JAK2^{V617F} resulta na ativação constitutiva de vias de sinalização e proteínas citoplasmáticas, incluindo STAT3, STAT5 e ERK. Esses alvos de JAK2 contribuem para a patogênese e progressão neoplásica nas NMP, no entanto, os mecanismos pelos quais estas proteínas participam nos processos oncogênicos são amplos e ainda permanecem sob investigação [42,47,55,115]. No presente trabalho, exposição de curta duração ao NT157 foi capaz de modular a via JAK2/STAT em células HEL, reduzindo o nível de ativação de ERK e inibindo a fosforilação de STAT3 e STAT5.

A inibição da fosforilação de STAT3 após tratamento com NT157 também foi descrita em múltiplas linhagens celulares de tumores sólidos, incluindo câncer de próstata, mama, melanoma, mieloma múltiplo e câncer colorretal [103,104,116]. Flashner-Abramson e colaboradores sugerem que a inibição de STAT3 seja um mecanismo independente da ação do composto sobre o eixo de IGF1R/IRS [103]. Estes dados são corroborados por resultados prévios de nosso grupo, que mostraram que o silenciamento de IRS2 mediado por lentivírus não resulta na inibição de STAT3 [97].

A ativação constitutiva de STAT3 é descrita em uma ampla gama de neoplasias, incluindo tumor pancreático, câncer gástrico e neoplasias mieloides induzidas por KRAS^{G12D} [103,117–121]. Embora STAT3 assuma função de promotor tumoral nessas neoplasias, trabalhos recentes identificaram que esta proteína também pode atuar como supressor tumoral [122]. Apesar de trabalhos *in vitro* revelarem STAT3 como um mediador de resistência à apoptose em células neoplásicas JAK2 mutadas, estudos *in vivo* apontam que Stat3 não é necessária para a expansão mieloide induzida por Jak2^{V617F} [123–125]. Outros estudos descrevem que em camundongos que expressam a mutação Jak2^{V617F}, a inibição de Stat3 aumenta a severidade da NMP desenvolvida e impacta negativamente na sobrevivência dos animais [126,127]. Dessa forma, a inibição direta de STAT3 pode não ser o principal evento que justifica os efeitos antineoplásicos observados após o tratamento com NT157 em células JAK2^{V617F}.

Nossos resultados demonstraram que em células JAK2^{V617F}, o tratamento com NT157 apresentou a vantagem de modular não apenas STAT3, inibindo concomitantemente, STAT5. Este outro membro da família de fatores de transcrição parece estar mais diretamente relacionado a expansão mieloide induzida por JAK2^{V617F} [115]. Em células Ba/F3, foi demonstrado que a ativação constitutiva de STAT5 é necessária para a transformação neoplásica mediada por JAK2^{V617F} [128]. *In vitro*, a inibição farmacológica de STAT5, utilizando-se pimozide potencializou os

efeitos de inibidor de JAK2, aumentando a morte em células HEL, SET2 e Ba/F3 JAK2^{V617F} [78].

Corroborando esses achados, *in vivo*, Yan e colaboradores demonstraram que Stat5 é requerido e apresenta um papel crítico para o desenvolvimento de PV em modelo murino [129]. Nesse modelo, a inibição da proteína normalizou os parâmetros hematológicos e o tamanho do baço em camundongos Jak2^{V617F} *knockin* que desenvolveram PV. Ao reativar a expressão de Stat5, os animais apresentaram novamente o fenótipo da doença. A inibição de Stat5 também aboliu completamente a formação espontânea de colônia eritroides, uma característica típica de células provenientes de PV cultivadas em metilcelulose [129]. Notavelmente, a perda de Stat5 não prejudica a hematopoese em camundongos adultos normais [129]. Este dado reforça o potencial terapêutico da inibição de STAT5 em NMP JAK2^{V617F}.

Nossos dados mostram que o tratamento com NT157 reduziu a ativação de STAT5. Como fator de transcrição, STAT5 regula a expressão de genes-chave para o controle de eventos envolvidos na oncogênese, incluindo sobrevivência dos clones neoplásicos e progressão do ciclo celular [130]. Este resultado pode explicar um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos antineoplásicos provocados pelo composto NT157 em células HEL JAK2^{V617F}.

Em células HEL JAK2^{V617F}, nós demonstramos que a exposição ao composto NT157 também resultou na diminuição da fosforilação de ERK1/2. Este resultado difere dos demais trabalhos que avaliaram os efeitos do inibidor. Reuveni e colaboradores encontraram aumento da ativação de ERK/MAPK após exposição ao composto, e sugerem que a degradação de IRS1/2 seja mediada por esta via [100,102,103].

A inibição lentiviral de IRS2 em células HEL JAK2^{V617F} também provocou aumento da fosforilação de ERK1/2 [97]. Dessa forma, acreditamos que devido a heterogeneidade das linhagens celulares, em células HEL, o composto NT157 pode atuar em outros pontos das vias intracelulares, apresentando um mecanismo de ação diferente do descrito em neoplasia sólida. A avaliação dos efeitos do tratamento com NT157 sobre a ativação desta via em outras linhagens celulares JAK2^{V617F} pode contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação da droga em modelos de NMP.

A análise do perfil de expressão de oncogenes e genes supressores tumorais através do *PCR array* revelou que o tratamento com NT157 resultou na redução dos níveis de RNA mensageiro de três relevantes oncogenes relacionados à patogênese das

neoplasias hematológicas, incluindo *CCND1*, *MYB* e *WT1*. A redução da expressão gênica de *CCND1* evidenciada pelo *PCR array* após o tratamento não explica a parada em G₂/M induzida pelo NT157, mas corrobora os dados da proliferação do Ki-67, pois quanto menor a quantidade de *CCND1*, menor a porcentagem de células em divisão celular [131,132]. Além disso, a redução da expressão deste oncogene é consistente com a redução da fosforilação de STAT3 e STAT5, visto que ambas proteínas regulam positivamente a expressão de *CCND1* [133,134].

WT1 é uma proteína com propriedades de supressor tumoral e oncogene, dependendo do tipo celular e tecido avaliado [135]. Em neoplasias hematológicas, *WT1* é descrito como um oncogene e sua alta expressão está relacionada com a alteração proliferativa, aumento de blastos, progressão para LMA e repressão de genes pró apoptóticos, como *BAK*, contribuindo para a sobrevivência das células neoplásicas [136–138]. Dessa forma, a redução dos níveis de expressão de *WT1* mediada pelo tratamento com NT157, pode ter atuado como mecanismo de indução apoptótica e redução proliferativa, como observado nos ensaios funcionais.

O tratamento com NT157 resultou no aumento da expressão gênica dos fatores de transcrição *FOS* e *JUN*. A proteína transcrita por *FOS* dimeriza com o fator de transcrição *JUN*, formando o complexo AP-1, que controla a expressão de múltiplos genes envolvidos na proliferação celular, apoptose e diferenciação [139]. É descrito que a ativação da proteína quinase JNK pode fosforilar o complexo AP-1, mediando apoptose induzida por estresse celular [140].

Em um amplo espectro de tumores, incluindo neoplasias hematológicas, o gene repressor tumoral que codifica a proteína p21 (*CDKN1A*) encontra-se reprimido e está relacionado com mau prognóstico [141]. Em células HEL não tratadas com NT157, observou-se uma baixa expressão de *CDKN1A*. Após tratamento, o composto NT157 induziu um aumento de 10 vezes nos níveis gênicos de *CDKN1A*. A proteína p21 é expressa principalmente na fase G₂/M através da atuação da proteína p53 durante o ponto de checagem [142]. Observamos que o NT157 aumenta a expressão gênica de p21 e a porcentagem de células na fase G₂/M. Os resultados indicam que o NT157 é capaz de levar a danos no DNA corroborando os dados da apoptose [140,143]. A redução dos níveis de *MYB* também pode estar contribuindo com a parada do ciclo celular observada em células HEL, visto que, em células hematopoéticas normais e neoplásicas, *MYB* contribui para a transição G₂/M através da regulação direta da expressão de Ciclina B1 [144].

Um dos objetivos do trabalho foi caracterizar os efeitos da combinação NT157 com ruxolitinibe. Nossos resultados mostraram que em células HEL JAK2^{V617F}, o tratamento isolado com NT157 apresenta resultados semelhantes, ou até melhores, quando se avalia apoptose e ciclo celular em comparação com o tratamento combinado. Em células HEL, a combinação das drogas não apresentou efeito potencializador e inclusive, ruxolitinibe parece prevenir a indução de apoptose e a parada do ciclo celular em G₂/M induzidos pelo tratamento com NT157. Dessa forma, a combinação apresentou um efeito citostático e reduziu os efeitos citotóxicos de NT157 na linhagem HEL. Esses resultados sugerem que NT157 representa uma potencial terapia, sobretudo em casos de resistência ao ruxolitinibe.

É relevante salientar que nossos resultados indicaram que a linhagem celular HEL JAK2^{V617F} representa um modelo relativamente resistente ao tratamento com ruxolitinibe. Ruxolitinibe 0,3 μ M não foi eficaz em induzir apoptose apesar de ter induzido inibição da via JAK2/STAT, conforme observado através da análise dos efeitos de diferentes concentrações de ruxolitinibe sobre a ativação de STAT3 e STAT5. A resistência ao ruxolitinibe pode estar relacionado com a ausência de efeito potencializador de ruxolitinibe e NT157 nestas células.

Para compreender melhor os efeitos do tratamento combinado em NMP, expandimos os experimentos do tratamento combinado para células SET2 JAK2^{V617F}. Essas células são provenientes da linhagem megacariocítica de um paciente com TE em transformação leucêmica [108] e representa um modelo mais próximo às características dos pacientes com NMP que apresentam mutação JAK2^{V617F} em heterozigose, apresentando maior sensibilidade ao tratamento com ruxolitinibe quando comparada as células HEL.

Em células SET2, observou-se um maior efeito do ruxolitinibe em comparação ao NT157 na redução da viabilidade celular, e um maior efeito do NT157 em comparação com o ruxolitinibe na indução da apoptose. Estes resultados sugerem que o ruxolitinibe pode estar atuando na redução da proliferação celular, enquanto o NT157 apresenta um maior efeito citotóxico, induzindo apoptose.

Uma das dificuldades ao trabalhar com as células SET2 foi a variação entre os experimentos. Os valores médios da viabilidade celular e apoptose obtidos no experimento realizado para verificar o tratamento isolado com NT157 diferiu daqueles obtidos quando avaliamos o tratamento combinado (para as mesmas doses e condições). Esta variação pode ter ocorrido devido a fatores únicos desta linhagem celular que

inclui sua capacidade de diferenciação espontânea para megacariócito [108], e maior suscetibilidade à apoptose basal, o que possivelmente pode modular as vias de sinalização intracelulares. Com base nessas considerações, é necessário ampliar o número de experimentos independentes.

Tendo como objetivo transpor a avaliação do efeito do tratamento com NT157 de linhagens celulares para amostras de células primárias de pacientes com NMP, avaliamos a ação de NT157 em células mononucleares de pacientes com PV. Em PV, as células são capazes de formar colônias eritroides, mesmo na ausência de EPO [27,112]. Notavelmente, NT157 preveniu esta proliferação anormal, reduzindo a formação espontânea de colônias eritroides.

Vislumbramos a necessidade de estabelecer um modelo *in vivo*. Para isso, partimos de um modelo descrito por Kirabo e colaboradores e implementamos a transformação das células HEL com o gene da luciferase [110,145]. Modelos murinos são mandatórios para a determinação do papel das mutações e para o desenvolvimento de ensaios pré-clínicos [146]. Esse modelo, em comparação com o estabelecido por Kirabo, tem a vantagem de permitir a avaliação da leucemogênese através da atividade biológica da luciferase. Deste modo, reduz-se o número amostral necessário e todos os animais podem ser mantidos para análise da sobrevida, além de dispensar a citometria de fluxo para determinar a enxertia da doença.

Diante da oportunidade de realizar um estudo preliminar do tratamento com NT157 no modelo murino estabelecido, avaliamos dois grupos de animais xenotransplantados, tratados com NT157 ou com o veículo. Nossos resultados indicaram que não houve diferença entre os grupos para todos os aspectos avaliados, incluindo características clínicas (peso corporal e esplenomegalia), carga tumoral (quantidade de células detectadas) e sobrevida. É relevante salientar que este modelo resulta no desenvolvimento de um quadro leucêmico agressivo, com um curto período de sobrevida. Nesse cenário, a adequação do esquema de tratamento pode ser necessária, uma vez que os animais receberam apenas uma dezena de doses ao longo da evolução da doença. Todos os grupos de pesquisa que descreveram o tratamento com NT157 *in vivo*, optaram por uma frequência de tratamento de três vezes por semana e doses entre 50 a 100 mg/kg. No entanto, estes testes foram realizados somente em tumores sólidos, com evolução clínica mais lenta [100,102,103]. Diante dessas considerações, adequações podem ser necessárias para se avaliar a eficácia do tratamento com NT157 *in vivo* em NMP.

Em relação ao modelo de xenotransplante com células HEL, uma possível estratégia para melhorar a avaliação do efeito de droga seria a redução do número de células injetadas para a indução neoplásica, o que poderia reduzir a agressividade da neoplasia e possibilitar um tratamento mais longo. Paralelamente, também pretendemos avaliar a formação de tumor sólido através da injeção local de células HEL no dorso de camundongos NSG e avaliar o efeito do NT157 sobre o crescimento tumoral.

Os resultados negativos do uso do NT157 em modelos de xenotransplante com células HEL não invalida a nossa hipótese de que IRS2 é um bom alvo terapêutico em NMP JAK2^{V617F}. Possivelmente questões relacionadas a farmacocinética e farmacodinâmica da droga resultaram no efeito final observado nos animais. Destacamos a inexistência de trabalhos que avaliam aspectos farmacológicos do composto. Futuramente, pretendemos realizar um estudo exploratório para verificar toxicidade, via de administração e concentração do composto nos diferentes tecidos hematopoéticos após o tratamento.

O NT157 atua em vias de sinalização envolvidas em processos celulares metabólicos essenciais, como a via de sinalização da insulina. O estudo do efeito do NT157 sobre o metabolismo energético e desenvolvimento se faz necessário e pode ser realizado através da avaliação de variáveis como peso corporal e concentração plasmática de lipídios, glicose e insulina.

Outra questão em aberto é o impacto da inibição das proteínas IRS1/2 na hematopoese normal. Dados do nosso grupo indicam que o NT157 não é tóxico para as células hematopoéticas normais em ensaios *in vitro*; em células hematopoéticas normais, o tratamento com NT157 não apresentou efeito citotóxico sobre a viabilidade celular, apoptose e capacidade de formação de colônias [147,148]. Para ampliar a investigação dos efeitos da inibição das proteínas IRS1/2 *in vivo*, pretendemos realizar estudos futuros utilizando camundongos normais expostos ao tratamento com NT157 e camundongos *knockout* para *Irs1* e *Irs2*. Os efeitos da depleção das proteínas *Irs* serão verificados através da análise das subpopulações hematopoéticas, aspectos hematológicos gerais, resposta ao estresse hematopoético, capacidade de reconstituição da hematopoese a curto e longo prazos e capacidade de autorrenovação das CTH. Os modelos *knockout* para *Irs1* e *Irs2* foram estabelecidos respectivamente em 1994 [149] e 1998, e têm sido extensivamente utilizados em estudos da via de sinalização da insulina, sobretudo em trabalhos relacionados a diabetes e obesidade. Estes

camundongos apresentam alterações no desenvolvimento, como redução do peso e redução da tolerância à glicose.

Em suma, em modelos de NMP JAK2^{V617F}, a inibição de IRS1/2 através do composto NT157 apresentou notáveis efeitos antineoplásicos. O tratamento resultou na inibição efetiva de STAT3, STAT5 e ERK, sugerindo que o composto apresenta um mecanismo duplo, tendo como alvos IGF1R/IRS e JAK2/STAT, duas das principais vias de sinalização desreguladas em NMP. A análise da expressão gênica de oncogenes e supressores tumorais possibilitou uma maior compreensão dos mecanismos moleculares da ação de NT157. Por atuar sobre múltiplos alvos, NT157 apresentou grande eficácia *in vitro*, inclusive e sobretudo, quando utilizado isoladamente. Nossos achados indicam que o composto NT157 emerge como uma possível alternativa terapêutica em NMP JAK2^{V617F}. A expansão dos estudos *in vivo* se faz necessária para a caracterização farmacocinética, farmacodinâmica e toxicológica do composto NT157, verificação de sua ação antineoplásica em modelos de NMP JAK2^{V617F} e avaliação de seus efeitos secundários sobre o metabolismo.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

- Em células HEL, modelo de NMP JAK2^{V617F}, o tratamento com o inibidor farmacológico das proteínas IRS1/2 apresenta notáveis efeitos antineoplásicos:
  - Redução da viabilidade, proliferação celular e clonogenicidade;
  - Indução da apoptose;
  - Atraso na progressão do ciclo celular;
- A avaliação dos efeitos do tratamento com NT157 na expressão gênica e expressão/ativação proteica em células HEL JAK2^{V617F}, possibilitou a identificação de múltiplos alvos da droga:
  - Inibição da fosforilação de STAT3 e STAT5;
  - Redução na ativação de ERK1/2;
  - Modulação de oncogenes e genes supressores tumorais.
- O tratamento combinado, utilizando NT157 e ruxolitinibe, não apresenta efeito adicional e os achados de apoptose e ciclo celular sugerem que o ruxolitinibe previne os efeitos citotóxicos de NT157 em células HEL JAK2^{V617F}.
- Em células SET2, NT157 induz efeitos antineoplásicos nas doses mais altas. O tratamento combinado em células SET2 não apresenta efeito potencializador em relação às monoterapias.
- Em células primárias de pacientes com PV, o tratamento com NT157 reduz a formação espontânea de colônias eritroides.
- *In vivo*, foi padronizado um modelo de camundongos xenotransplantados com células HEL^{luc} para tratamento com NT157:
  - As células HEL^{luc} sobrevivem ao transplante e induzem leucemia sistêmica;

- A leucemogênese pode ser acompanhada através da atividade biológica da luciferase;
- A sobrevida mediana dos animais é de 26 dias pós-transplante;
- O tratamento com NT157 neste modelo, nas doses e frequência adotadas, não alterou o desenvolvimento leucêmico e a sobrevida dos animais.

Em conclusão, em células HEL, modelo de NMP JAK2^{V617F}, o inibidor farmacológico de IRS1/2, NT157: (i) inibiu a expressão de IRS1/2 e inibiu a ativação de STAT3, STAT5 e ERK, (ii) reduziu a expressão dos oncogenes *CCND1* (*Ciclina D1*), *MYB* e *WT1* e aumentou a expressão dos genes supressores tumorais *CDKN1A* (*p21*), *FOS* e *JUN*, (iii) apresentou efeitos antineoplásicos; reduziu a viabilidade, proliferação, clonogenicidade; atrasou a progressão do ciclo celular em G2/M e aumentou a apoptose. Os efeitos antineoplásicos do NT157 foram validados em linhagem celular SET2 e amostras primárias de pacientes com policitemia vera.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- [1] HOFFBRAND, A. V. MOSS, P. A. **Fundamentos em Hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- [2] REGO, E. M. Hematopoese: Regulação e microambiente. In: ZAGO, M. .; FALCAO, R. P.; R., P. (Eds.). . **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 15–22.
- [3] CHRISTENSEN, J. L. et al. Circulation and Chemotaxis of Fetal Hematopoietic Stem Cells. **PLoS Biology**, v. 2, n. 3, p. e75, 16 mar. 2004.
- [4] DOULATOV, S. et al. Hematopoiesis: A Human Perspective. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 2, p. 120–136, 3 fev. 2012.
- [5] RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 12, 1 dez. 2012.
- [6] MAYLE, A. et al. Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 83, n. 1, p. 27–37, jan. 2013.
- [7] GÖTTGENS, B. Regulatory network control of blood stem cells. **Blood**, v. 125, n. 17, 2015.
- [8] KRAUSE, D. et al. CD34: structure, biology, and clinical utility [see comments]. **Blood**, v. 87, n. 1, 1996.
- [9] SUN, J. et al. Clonal dynamics of native haematopoiesis. **Nature**, v. 514, n. 7522, p. 322–327, 5 out. 2014.
- [10] WANG, Z.; EMA, H. Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells. **International Journal of Hematology**, v. 103, n. 5, p. 498–509, 12 maio 2016.
- [11] KNOBLICH, J. A. et al. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 583–597, 22 fev. 2008.
- [12] YAMASHITA, Y. M. et al. Polarity in Stem Cell Division: Asymmetric Stem Cell Division in Tissue Homeostasis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 1, p. a001313–a001313, 1 jan. 2010.
- [13] AKASHI, K. et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 193–197, 9 mar. 2000.
- [14] KAUSHANSKY, K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 19, p. 2034–2045, 11 maio 2006.
- [15] REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105–111, 1 nov. 2001.
- [16] XIE, M. et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. **Nature Medicine**, v. 20, n. 12, p. 1472–1478, 19 out. 2014.

- [17] VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, 2009.
- [18] VASANTHAKUMAR, A.; GODLEY, L. A. On the Origin of Leukemic Species. **Stem Cell**, v. 14, p. 421–422, 2014.
- [19] SPIVAK, J. L. et al. Chronic myeloproliferative disorders. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 200–24, 2003.
- [20] CAMPBELL, P. J.; GREEN, A. R. The Myeloproliferative Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 23, p. 2452–2466, 7 dez. 2006.
- [21] VARDIMAN, J. W. et al. Myeloproliferative Neoplasms. In: **WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. ed. France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008. p. 31–66.
- [22] TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 14–22, 20 jan. 2008.
- [23] ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.
- [24] SPIVAK, J. L. et al. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. **Seminars in hematology**, v. 41, n. 2 Suppl 3, p. 1–5, abr. 2004.
- [25] UGO, V. et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. **Experimental Hematology**, v. 32, n. 2, p. 179–187, 2004.
- [26] MULLER, E. W. et al. Recombinant human mast cell growth factor supports erythroid colony formation in polycythemia vera in the presence and absence of erythropoietin and serum. **Experimental hematology**, v. 21, n. 10, p. 1353–7, set. 1993.
- [27] PARTANEN, S. et al. Spontaneous erythroid colony formation in the differential diagnosis of erythrocytosis. **European journal of haematology**, v. 42, n. 4, p. 327–30, abr. 1989.
- [28] EMANUEL, R. M. et al. Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs. **J Clin Oncol**, v. 30, p. 4098–4103, 2012.
- [29] LANDOLFI, R. et al. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Pathogenetic mechanisms and prevention. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 19, n. 3, p. 617–633, set. 2006.
- [30] MARCHIOLI, R. et al. Vascular and Neoplastic Risk in a Large Cohort of Patients With Polycythemia Vera. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 10, p. 2224–2232, 1 abr. 2005.
- [31] HULTCRANTZ, M. et al. Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: a population-

based study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 24, p. 2995–3001, 20 ago. 2012.

[32] VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 667–679, 9 fev. 2016.

[33] BARBUI, T. et al. Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. **Blood cancer journal**, v. 5, n. 11, p. e369, 27 nov. 2015.

[34] PARNES, A.; RAVI, A. Polycythemia and Thrombocytosis. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 43, n. 4, p. 589–605, dez. 2016.

[35] TEFFERI, A. et al. Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera: Focus on Clinical Practice. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, p. 1283–1293, 2015.

[36] GEYER, H.; MESA, R. A. Assessing disease burden in patients with classic MPNs. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 27, n. 2, p. 107–119, jun. 2014.

[37] SAVONA, M. R. Are we altering the natural history of primary myelofibrosis? **Leukemia Research**, v. 38, p. 1004–1012, 2014.

[38] BARBUI, T. et al. Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis: An International Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 23, p. 3179–3184, 10 ago. 2011.

[39] GUGLIELMELLI, P. et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. **Blood**, p. blood-2017-01-761999, 28 mar. 2017.

[40] TEFFERI, A. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 16, p. 2507–13; quiz 2615, 16 out. 2014.

[41] BAROSI, G. et al. Evidence that Prefibrotic Myelofibrosis Is Aligned along a Clinical and Biological Continuum Featuring Primary Myelofibrosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35631, 20 abr. 2012.

[42] DELHOMMEAU, F. et al. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p. 2939–2953, 27 dez. 2006.

[43] CROSS, N. C. P. Genetic and Epigenetic Complexity in Myeloproliferative Neoplasms. **Hematology**, v. 2011, n. 1, p. 208–214, 1 dez. 2011.

[44] RAMPAL, R. et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. **Blood**, v. 123, n. 22, 2014.

[45] VAINCHENKER, W.; CONSTANTINESCU, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. **Oncogene**, v. 32, n. 21, p. 2601–2613, 23 maio 2013.

[46] KRALOVICS, R. et al. A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 17, p. 1779–1790, 28 abr. 2005.

- [47] JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1144–1148, 28 abr. 2005.
- [48] BAXTER, E. J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **The Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1054–1061, mar. 2005.
- [49] LEVINE, R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 387–397, abr. 2005.
- [50] PIKMAN, Y. et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e270, 18 jul. 2006.
- [51] KLAMPFL, T. et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2379–2390, 19 dez. 2013.
- [52] NANGALIA, J. et al. Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2*. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2391–2405, 19 dez. 2013.
- [53] O'SHEA, J. J.; HOLLAND, S. M.; STAUDT, L. M. JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 2, p. 161–170, 10 jan. 2013.
- [54] LEVINE, R. L. et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p. 673–683, set. 2007.
- [55] LEVINE, R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 387–397, abr. 2005.
- [56] GIORDANETTO, F.; KROEMER, R. T. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. **Protein engineering**, v. 15, n. 9, p. 727–37, set. 2002.
- [57] SAHARINEN, P.; SILVENNOINEN, O. The Pseudokinase Domain Is Required for Suppression of Basal Activity of Jak2 and Jak3 Tyrosine Kinases and for Cytokine-inducible Activation of Signal Transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 47954–47963, 6 dez. 2002.
- [58] QUINTÁS-CARDAMA, A. et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 2, p. 127–140, fev. 2011.
- [59] KISSELEVA, T. et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene**, v. 285, n. 1, p. 1–24, 2002.
- [60] HARRISON, C. N.; MCMULLIN, M. F. Update in the myeloproliferative neoplasms. **Clinical Medicine**, v. 14, n. Suppl_6, p. s66–s70, 1 dez. 2014.
- [61] RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1281–1283, 15 mar. 2004.
- [62] AITTOMÄKI, S.; PESU, M. Therapeutic Targeting of the JAK/STAT Pathway. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 18–23, jan. 2014.

- [63] WALZ, C. et al. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. **Blood**, v. 119, n. 15, p. 3550–60, 12 abr. 2012.
- [64] PARDANANI, A. JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. **Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 23–30, 20 jan. 2008.
- [65] VERSTOVSEK, S. Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. **Hematology**, v. 2009, n. 1, p. 636–642, 1 jan. 2009.
- [66] NAKAYA, Y. et al. Efficacy of NS-018, a potent and selective JAK2/Src inhibitor, in primary cells and mouse models of myeloproliferative neoplasms. **Blood cancer journal**, v. 1, n. 7, p. e29, jul. 2011.
- [67] LEROY, E.; CONSTANTINESCU, S. N. Rethinking JAK2 inhibition: towards novel strategies of more specific and versatile janus kinase inhibition. **Leukemia**, v. 31, n. 5, p. 1023–1038, 25 maio 2017.
- [68] SANTOS, F. P. S.; VERSTOVSEK, S. JAK2 inhibitors: What's the true therapeutic potential? **Blood Reviews**, v. 25, n. 2, p. 53–63, mar. 2011.
- [69] HARRISON, C. et al. JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 9, p. 787–798, mar. 2012.
- [70] VERSTOVSEK, S. et al. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 9, p. 799–807, mar. 2012.
- [71] VERSTOVSEK, S. et al. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. **Journal of hematology & oncology**, v. 10, n. 1, p. 55, 22 fev. 2017.
- [72] BOSE, P.; VERSTOVSEK, S. Myelofibrosis: an update on drug therapy in 2016. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 18, p. 2375–2389, 11 dez. 2016.
- [73] CERVANTES, F.; PEREIRA, A. Does ruxolitinib prolong the survival of patients with myelofibrosis? **Blood**, 2016.
- [74] MEYER, S. C.; LEVINE, R. L. Molecular Pathways: Molecular Basis for Sensitivity and Resistance to JAK Kinase Inhibitors. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 8, p. 2051–2059, 15 abr. 2014.
- [75] BHAGWAT, N.; LEVINE, R. L.; KOPPIKAR, P. Sensitivity and resistance of JAK2 inhibitors to myeloproliferative neoplasms. **International Journal of Hematology**, v. 97, n. 6, p. 695–702, 14 jun. 2013.
- [76] BOGANI, C. et al. mTOR Inhibitors Alone and in Combination with JAK2 Inhibitors Effectively Inhibit Cells of Myeloproliferative Neoplasms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54826, 31 jan. 2013.
- [77] CHOONG, M. L. et al. Combination treatment for myeloproliferative neoplasms using JAK and pan-class I PI3K inhibitors. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 17, n. 11, p. 1397–409, nov. 2013.

- [78] BAR-NATAN, M. et al. Dual inhibition of Jak2 and STAT5 enhances killing of myeloproliferative neoplasia cells. **Leukemia**, v. 26, n. 6, p. 1407–1410, 2 jun. 2012.
- [79] WHITE, M. F.; MARON, R.; KAHN, C. R. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. **Nature**, v. 318, n. 6042, p. 183–186, 14 nov. 1985.
- [80] PATTI, M. E. et al. 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24670–3, 20 out. 1995.
- [81] SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73–77, 4 jul. 1991.
- [82] SAWKA-VERHELLE, D. et al. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 11, p. 5980–3, 15 mar. 1996.
- [83] YENUSH, L. et al. The pleckstrin homology domain is the principal link between the insulin receptor and IRS-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 39, p. 24300–6, 27 set. 1996.
- [84] SAAD, M. J. et al. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 36, p. 22100–4, 6 set. 1996.
- [85] SUN, X. J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 173–177, 14 set. 1995.
- [86] SUN, X. J. et al. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 12, p. 7418–28, dez. 1993.
- [87] VERDIER, F. et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 42, p. 26173–8, 17 out. 1997.
- [88] SCHACHER, D. H. et al. Developmental expression of insulin receptor substrate-2 during dimethylsulfoxide-induced differentiation of human HL-60 cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 1, p. 113–20, 1 jan. 2000.
- [89] MIYAKAWA, Y. et al. Thrombopoietin Induces Phosphoinositol 3-Kinase Activation through SHP2, Gab, and Insulin Receptor Substrate Proteins in BAF3 Cells and Primary Murine Megakaryocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2494–2502, 26 jan. 2001.
- [90] RICHMOND, T. D.; CHOCHAN, M.; BARBER, D. L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 146–155, mar. 2005.
- [91] KHANDWALA, H. M. et al. The Effects of Insulin-Like Growth Factors on Tumorigenesis and Neoplastic Growth. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 3, p. 215–244, jun. 2000.

- [92] KAUSHANSKY, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3339–3347, 1 dez. 2005.
- [93] MENON, M. P.; FANG, J.; WOJCHOWSKI, D. M. Core erythropoietin receptor signals for late erythroblast development. **Blood**, v. 107, n. 7, 2006.
- [94] MACHADO-NETO, J. A. et al. Downregulation of IRS2 in myelodysplastic syndrome: A possible role in impaired hematopoietic cell differentiation. **Leukemia Research**, v. 36, n. 7, p. 931–935, jul. 2012.
- [95] DEARTH, R. K. et al. Oncogenic Transformation by the Signaling Adaptor Proteins Insulin Receptor Substrate (IRS)-1 and IRS-2. **Cell Cycle**, v. 6, n. 6, p. 705–713, 15 mar. 2007.
- [96] BOISSAN, M. et al. Overexpression of Insulin Receptor Substrate-2 in Human and Murine Hepatocellular Carcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 3, p. 869–877, set. 2005.
- [97] DE MELO CAMPOS, P. et al. IRS2 silencing increases apoptosis and potentiates the effects of ruxolitinib in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. **Oncotarget**, v. 7, n. 6, p. 6948–59, 9 fev. 2016.
- [98] OSORIO, F. G. et al. Loss of the proteostasis factor AIRAPL causes myeloid transformation by deregulating IGF-1 signaling. **Nature Medicine**, v. 22, n. 1, p. 91–96, 2016.
- [99] O’FLANAGAN, C. H. et al. IGF-1R inhibition sensitizes breast cancer cells to ATM-Related Kinase (ATR) inhibitor and cisplatin. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56826–56841, 29 ago. 2016.
- [100] REUVENI, H. et al. Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment. **Cancer Research**, v. 73, n. 14, p. 4383–4394, 2013.
- [101] ASCIERTO, P. A. et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of translational medicine**, v. 10, p. 85, 9 jul. 2012.
- [102] IBUKI, N. et al. The Tyrphostin NT157 Suppresses Insulin Receptor Substrates and Augments Therapeutic Response of Prostate Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2014.
- [103] FLASHNER-ABRAMSON, E. et al. Targeting melanoma with NT157 by blocking Stat3 and IGF1R signaling. **Oncogene**, v. 35, n. 20, p. 2675–2680, 19 maio 2016.
- [104] SANCHEZ-LOPEZ, E. et al. Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 Receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling HHS Public Access. **Oncogene**. May, v. 1920, n. 35, p. 2634–2644, 2016.
- [105] QUENTMEIER, H. et al. JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. **Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 20, p. 471–476, 2006.
- [106] MARTIN, P.; PAPAYANNOPOULOU, T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. **Science**, v. 216, n. 4551, p. 1233–5, 11 jun. 1982.

- [107] PAPAYANNOPOULOU, T. et al. Human Erythroleukemia Cell Line (HEL) Undergoes a Drastic Macrophage-Like Shift With TPA. **Blood**, v. 62, n. 4, p. 832–845, 1983.
- [108] UOZUMI, K. et al. Establishment and characterization of a new human megakaryoblastic cell line (SET-2) that spontaneously matures to megakaryocytes and produces platelet-like particles. **Leukemia**, v. 14, n. 1, p. 142–152, 6 jan. 2000.
- [109] LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- [110] KIRABO, A. et al. The Small Molecule Inhibitor G6 Significantly Reduces Bone Marrow Fibrosis and the Mutant Burden in a Mouse Model of Jak2-Mediated Myelofibrosis. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 3, p. 858–865, set. 2012.
- [111] SOUZA, L. E. B. DE. **Geração de organoides vascularizados como veículos produtores do fator VIII da coagulação em um modelo murino de hemofilia A**. 2016. 117 f. Tese (Doutorado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2016.
- [112] DE WOLF, J. T. et al. In polycythemia vera human interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance erythroid colony growth in the absence of erythropoietin. **Experimental hematology**, v. 17, n. 9, p. 981–3, out. 1989.
- [113] POLLAK, M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 3, p. 159–69, 16 fev. 2012.
- [114] GAROFALO, C. et al. Preclinical effectiveness of selective inhibitor of IRS-1/2 NT157 in osteosarcoma cell lines. **Frontiers in Endocrinology**, 2015.
- [115] CHEN, E.; MULLALLY, A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2014, n. 1, p. 268–76, 5 dez. 2014.
- [116] RAMPIAS, T. et al. Targeting tumor-stroma crosstalk: the example of the NT157 inhibitor. **Oncogene advance online publication**, 2015.
- [117] YU, H. et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 736–746, 24 out. 2014.
- [118] KOTA, J.; CACERES, N.; CONSTANTINESCU, S. N. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 22, n. 10, p. 1828–1840, 4 out. 2008.
- [119] CORCORAN, R. B. et al. STAT3 Plays a Critical Role in KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 71, n. 14, p. 5020–5029, 15 jul. 2011.
- [120] GOUGH, D. J. et al. STAT3 supports experimental K-RasG12D-induced murine myeloproliferative neoplasms dependent on serine phosphorylation. **Blood**, v. 124, n. 14, p. 2252–2261, 2 out. 2014.
- [121] BRONTE-TINKEW, D. M. et al. Helicobacter pylori Cytotoxin-Associated Gene A Activates the Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway In vitro

and In vivo. **Cancer Research**, v. 69, n. 2, p. 632–639, 15 jan. 2009.

[122] DE LA IGLESIA, N. et al. Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. **Genes & Development**, v. 22, n. 4, p. 449–462, 15 fev. 2008.

[123] MESA, R. A. et al. Janus kinase 2 (V617F) mutation status, signal transducer and activator of transcription-3 phosphorylation and impaired neutrophil apoptosis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Leukemia**, v. 20, n. 10, p. 1800–1808, 27 out. 2006.

[124] YAN, D. et al. Deletion of Stat3 enhances myeloid cell expansion and increases the severity of myeloproliferative neoplasms in Jak2V617F knock-in mice HHS Public Access. **Leukemia**, v. 29, n. 10, p. 2050–2061, 2015.

[125] MOHI, G. Stat3 Negatively Regulates Myeloproliferative Neoplasm Induced By Jak2V617F. **Blood**, v. 122, n. 21, 2013.

[126] YAN, D. et al. Deletion of Stat3 enhances myeloid cell expansion and increases the severity of myeloproliferative neoplasms in Jak2V617F knock-in mice. **Leukemia**, v. 29, n. 10, p. 2050–61, out. 2015.

[127] GRISOUARD, J. et al. Deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhances thrombocytosis and shortens survival in a JAK2-V617F mouse model of MPN. **Blood**, v. 125, n. 13, 2015.

[128] FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 8, p. 5296–307, 19 fev. 2010.

[129] YAN, D.; HUTCHISON, R. E.; MOHI, G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. **Blood**, v. 119, n. 15, p. 3539–49, 12 abr. 2012.

[130] MIKLOSSY, G.; HILLIARD, T. S.; TURKSON, J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 8, p. 611–29, ago. 2013.

[131] NELSEN, C. J. et al. Evidence That Cyclin D1 Mediates Both Growth and Proliferation Downstream of TOR in Hepatocytes. **Blood**, 2002.

[132] DIEHL, J. A. Cycling to cancer with cyclin D1. **Cancer biology & therapy**, v. 1, n. 3, p. 226–31, 2002.

[133] MATSUMURA, I. et al. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 5, p. 1367–1377, 1 mar. 1999.

[134] GÄBLER, K.; BEHRMANN, I.; HAAN, C. JAK2 mutants (e.g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms. **JAK-STAT**, v. 2, n. 3, p. e25025, 1 jul. 2013.

[135] YANG, L. et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. **Leukemia**, v. 21, n. 5, p. 868–76, 15 mar. 2007.

[136] SZÁNTÓ, A. et al. Real-time quantitative PCR detection of WT1 and M-BCR-ABL expressions in chronic myeloid leukemia. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 56, n. 2 Suppl, p.

703–7, 2015.

[137] YAMAGAMI, T. et al. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. **Blood**, v. 87, n. 7, p. 2878–84, 1 abr. 1996.

[138] ITO, K. et al. Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. **Oncogene**, v. 25, n. 30, p. 4217–4229, 13 jul. 2006.

[139] SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. E131–E136, 1 maio 2002.

[140] HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2603–14, 1 nov. 2001.

[141] ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–14, jun. 2009.

[142] CAO, L. et al. A Novel ATM/TP53/p21-Mediated Checkpoint Only Activated by Chronic γ -Irradiation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104279, 5 ago. 2014.

[143] DIPOLA, R. S. To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. Clin. cancer res., 8: 3512-3519, 2002. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 11, p. 3311–4, nov. 2002.

[144] NAKATA, Y. et al. c-Myb contributes to G2/M cell cycle transition in human hematopoietic cells by direct regulation of cyclin B1 expression. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 6, p. 2048–58, mar. 2007.

[145] PASSIPIERI, J. A. et al. Improvement of cardiac function by placenta-derived mesenchymal stem cells does not require permanent engraftment and is independent of the insulin signaling pathway. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 4, p. 102, 2014.

[146] MOROTTI, A. et al. Modeling myeloproliferative neoplasms: From mutations to mouse models and back again. **Blood Reviews**, 24 nov. 2016.

[147] RODRIGUES ALVES, A. P. N. et al. Pharmacological IGF1R/IRS Inhibitor, NT157, Effectively Induces Apoptosis and CDKN1A Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. **Blood**, v. 128, n. 22, 2016.

[148] SCOPIM-RIBEIRO, R. et al. Pharmacological IRS1/2 Inhibition Reduces Cell Viability in BCR-ABL1 Positive Cells. **Blood**, v. 126, n. 23, 2015.

[149] ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186–190, 10 nov. 1994.

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação funcional da participação de IRS2 em neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas

Pesquisador: Fabíola Traina

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53277116.6.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.512.110

Apresentação do Projeto:

As neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas (NMP) apresentam como característica comum a ocorrência de proliferação celular exacerbada, mantendo a capacidade de diferenciação mieloide terminal. Em parcela significativa dos casos, a ativação da proliferação celular ocorre pelo aumento da atividade tirosina quinase de proteínas específicas. Entretanto, a heterogeneidade molecular observada nos pacientes e as respostas clínicas insatisfatórias observadas em parte dos casos com os tratamentos vigentes sugerem que mecanismos adicionais, como interações proteicas não descritas e novas mutações, possam estar envolvidos na fisiopatologia destas neoplasias. Os objetivos deste projeto são avaliar os efeitos do tratamento combinado de ruxolitinib e inibidores de IRS2 ou mTOR em células JAK2 V617F e estabelecer um modelo murino de animais knockout *Irs2*. Linhagens leucêmicas e células primárias humanas serão utilizadas para os estudos funcionais; modelo murino de animais knockout *Irs2* será estabelecido. Os métodos incluem avaliação da sobrevivência celular e da ativação de vias de sinalização em células leucêmicas humanas submetidas a diferentes condições de inibição das proteínas de interesse através da metodologia de terapia gênica e/ou uso de inibidores específicos, estabelecimento de modelo murino knockout *Irs2* e avaliação da hematopoese neste modelo.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.512.110

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos principais estão apresentados como subprojetos, cada um com seus objetivos específicos detalhados.

Subprojeto 1: Investigar o efeito combinado da inibição farmacológica de JAK2 e IRS2 em modelos de neoplasia mieloide JAK2(V617F) e JAK2(WT) -Verificar o efeito do tratamento combinado ou não de ruxolitinib e NT157 na proliferação, clonogenicidade e apoptose em células JAK2(V617F) e JAK2(wt) - Determinar o efeito do tratamento combinado ou não de ruxolitinib e NT157 nas vias de sinalização JAK/STAT, PI3K/Akt/mTOR e MAPK em células JAK2(V617F) e JAK2(wt).

Subprojeto 2: Investigar o efeito combinado ruxolitinib e metformina em modelos de neoplasia mieloide JAK2(V617F) e JAK2(WT) - Avaliar o efeito da metformina sobre a ativação de mTOR em células leucêmicas JAK2(V617F) e JAK2(wt) -Verificar o efeito do tratamento combinado ou não de ruxolitinib e metformina na proliferação, clonogenicidade e apoptose em células JAK2(V617F) e JAK2(wt) -Determinar o efeito do tratamento combinado ou não de ruxolitinib e metformina nas vias de sinalização JAK/STAT, AMPK/mTOR e MAPK em células JAK2(V617F) e JAK2(wt).

Subprojeto 3: Estabelecimento do modelo murino knockout para *Irs2* e avaliação da hematopoese nestes animais - Adquirir e estabelecer os camundongos knockout para *Irs2* na FMRP USP - Isolar as diferentes populações de progenitores hematopoéticos da medula óssea por sorting e verificar o perfil de expressão de *Irs2* nas diferentes subpopulações hematopoéticas -Verificar os aspectos hematológicos dos camundongos knockout para *Irs2* in vivo, incluindo dados de hemograma e análise das subpopulações hematopoéticas da medula óssea e baço.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Existem os riscos inerentes à punção venosa e à punção da medula óssea e estão explicitados no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O benefício esperado é que as informações obtidas por este trabalho poderão auxiliar no melhor entendimento e contribuir para a descoberta de novas opções de tratamento da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta todos os aspectos pertinentes à pesquisa que será realizada. Trata-se de um trabalho prospectivo e realizado in vitro no qual a participação dos pacientes será a doação de 8mL de sangue periférico ou de medula óssea para a realização dos testes. As coletas já seriam executadas para fins diagnósticos ou de acompanhamento dos pacientes.

retrospectivo para analisar os casos de cisticercose notificados em Ribeirão Preto e região nos últimos 20 anos. Serão avaliados vários aspectos da doença e de sua evolução e a busca de dados será realizada em prontuários de pacientes atendidos nesta instituição.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.512.110

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o TCLE Versão: 2 (28.03.2016).

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão: 2 (28.03.2016) podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_650599.pdf	06/04/2016 19:34:45		Aceito
Outros	Resposta_ao_parecer_CEP_Projeto_IRS2_NMP.doc	06/04/2016 19:03:36	Fabiola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NMP06_versao2.doc	29/03/2016 08:38:26	Fabiola Traina	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinadaNMP.pdf	16/02/2016 11:29:53	Fabiola Traina	Aceito
Outros	Orcamento_UPC_06_01_16.pdf	06/01/2016 17:41:43	Fabiola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NMP06_01_2015.pdf	06/01/2016 17:40:38	Fabiola Traina	Aceito
Orçamento	Orcamento06_01_2016.pdf	06/01/2016 17:39:38	Fabiola Traina	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetodePesquisa06_01_2016.pdf	06/01/2016 17:39:25	Fabiola Traina	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.512.110

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 18 de Abril de 2016

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

ANEXO B - Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo CEUA 004/2016-1)

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Investigação do efeito do tratamento combinado de inibidores farmacológicos de JAK2 e IRS2 ou mTOR em células JAK2V617F*", registrado com o número **004/2016-1**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Fabíola Traina**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 27 de junho de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 24 camundongos NOD/SCID gama machos pesando 22g, oriundos do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 27/06/2016 a 01/03/2018.

We certify that the Protocol n° 004/2016-1, entitled "*Investigation of the effect of combined treatment with pharmacological inhibitors of JAK2 and IRS2 or mTOR in JAK2V617F cells*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 06/27/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum *Chordata*, subphylum *Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 24 male NOD/SCID gama mice weighing 22g from the Laboratory of Experimental Studies in Animals of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 03/01/2018.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

APÊNDICE

APÊNDICE

APÊNDICE A - Tabela Suplementar 1: Oncogenes e genes supressores tumorais humanos avaliados por PCR array

Tabela Suplementar 1: Oncogenes e genes supressores tumorais humanos avaliados por PCR array

Posição na placa	Gene	Fold Change em relação ao controle
A12	<i>CCND1</i>	0,2404
C05	<i>HGF</i>	0,4573
B01	<i>CDH1</i>	0,4575
E12	<i>RARA</i>	0,4755
B05	<i>CDKN2B</i>	0,5346
D01	<i>KIT</i>	0,61
C02	<i>FHIT</i>	0,6176
G09	<i>WT1</i>	0,6354
E10	<i>PRKCA</i>	0,6371
D11	<i>MYB</i>	0,6388
E09	<i>PML</i>	0,6415
E04	<i>NFKB1</i>	0,6456
B04	<i>CDKN2A</i>	0,6603
F10	<i>SH3PXD2A</i>	0,6617
E05	<i>NFKBIA</i>	0,6787
F08	<i>S100A4</i>	0,72
C01	<i>ETS1</i>	0,7224
B06	<i>CDKN3</i>	0,7299
E01	<i>MYCN</i>	0,7514
G03	<i>TGFB1</i>	0,7594
D09	<i>MLH1</i>	0,7873
F01	<i>RASSF1</i>	0,7889
C12	<i>JUND</i>	0,7903
B12	<i>ESR1</i>	0,7997
A03	<i>APC</i>	0,818
F05	<i>ROS1</i>	0,8187
G01	<i>STAT3</i>	0,8238
D10	<i>MOS</i>	0,8272
A04	<i>ATM</i>	0,8343
C09	<i>JAK2</i>	0,8419
B02	<i>CDK4</i>	0,842
A08	<i>BCR</i>	0,8604
H05	<i>ACTB</i>	0,8628
G11	<i>XRCC1</i>	0,8644
H01	<i>B2M</i>	0,8724
E08	<i>PIK3CA</i>	0,8783
G05	<i>TP53</i>	0,8783
G02	<i>STK11</i>	0,883
G12	<i>ZHX2</i>	0,9164
G08	<i>VHL</i>	0,9197
A07	<i>BCL2L1</i>	0,9251
G06	<i>TP73</i>	0,9258
E03	<i>NF2</i>	0,9365
E06	<i>NRAS</i>	0,9367

D08	<i>MGMT</i>	0,9408
B07	<i>CTNNB1</i>	0,9637
F02	<i>RB1</i>	0,9703
B10	<i>ELK1</i>	0,9771
C11	<i>JUNB</i>	0,981
C07	<i>HRAS</i>	0,9929
A09	<i>BRCA1</i>	1,0223
D06	<i>MEN1</i>	1,039
F04	<i>RET</i>	1,0416
A05	<i>BAX</i>	1,0566
F09	<i>SERPINB5</i>	1,06
H04	<i>GAPDH</i>	1,0823
D12	<i>MYC</i>	1,0884
G10	<i>WWOX</i>	1,0885
H02	<i>HPRT1</i>	1,1002
H03	<i>RPL13A</i>	1,1157
A02	<i>AKT1</i>	1,1217
D03	<i>KRAS</i>	1,1508
H12	<i>PPC</i>	1,1599
H07	<i>RTC</i>	1,1624
H08	<i>RTC</i>	1,1624
B11	<i>ERBB2</i>	1,1665
G07	<i>TSC1</i>	1,1671
E11	<i>RAF1</i>	1,1828
F11	<i>SMAD4</i>	1,1837
H10	<i>PPC</i>	1,1864
B08	<i>E2F1</i>	1,1922
H11	<i>PPC</i>	1,2019
F03	<i>REL</i>	1,2039
C08	<i>IGF2R</i>	1,2213
G04	<i>TNF</i>	1,2563
A01	<i>ABL1</i>	1,2631
E02	<i>NF1</i>	1,3117
H06	<i>HGDC</i>	1,3277
H09	<i>RTC</i>	1,3291
D04	<i>MCL1</i>	1,3385
A11	<i>CASP8</i>	1,3491
D05	<i>MDM2</i>	1,3669
C06	<i>HIC1</i>	1,4396
D02	<i>KITLG</i>	1,444
F06	<i>RUNX1</i>	1,4542
F12	<i>SRC</i>	1,4542
A10	<i>BRCA2</i>	1,4946
A06	<i>BCL2</i>	1,5472
F07	<i>RUNX3</i>	1,5896
E07	<i>PIK3C2A</i>	1,7171
C03	<i>FOS</i>	1,9211
C10	<i>JUN</i>	2,2852
B09	<i>EGF</i>	2,653
C04	<i>FOXD3</i>	3,4685
D07	<i>MET</i>	5,4541
B03	<i>CDKN1A</i>	9,9616

Resultado para amostras tratadas com NT157 0,8 μ M em relação ao controle não tratado.

Genes evidenciados em negrito apresentaram expressão relativa com fold change de 1,5, em relação ao controle.