**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Cristina Tavares Leal

**Identificação da família BCL2 como alvo terapêutico no
tratamento das neoplasias mieloproliferativas associadas
à mutação da JAK2^{V617F}**

**Ribeirão Preto
2017**

CRISTINA TAVARES LEAL

**Identificação da família BCL2 como alvo terapêutico no
tratamento das neoplasias mieloproliferativas associadas
à mutação da JAK2^{V617F}**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.
Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientador: Dra. Lorena Lobo de Figueiredo Pontes

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).**

**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.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação Médica

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Leal, Cristina Tavares

Identificação da família BCL2 como alvo terapêutico no tratamento das neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação JAK2^{V617F} – Ribeirão Preto, 2017.

116 f

Dissertação (mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Departamento de Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Orientador: Figueiredo-Pontes, Lorena Lobo de

1. neoplasias mieloproliferativas, 2. Apoptose, 3. BCL2, 4. inibidor de BCL2, 5. inibidor da JAK2.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cristina Tavares Leal

Identificação da família BCL2 como alvo terapêutico no tratamento das neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação JAK2^{V617F}.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus.

À minha família, em especial meus pais e meu esposo, Thiago, pelo apoio incondicional e paciência. A minha filha amada, Laura. À meus irmãos; Wilme, Adalgiza, Karol e Camila pelo carinho sempre.

À minha orientadora, Dra. Lorena, pela oportunidade e confiança. Obrigada pelos conhecimentos, paciência e tolerância durante todo o desenvolvimento deste projeto.

À Adriana, pelos incontáveis momentos de ajuda e companheirismo na execução deste projeto. Sem você, Dri, teria sido muito mais difícil.

Aos demais colegas de pós graduação, em especial Izabela, pela disponibilidade e carinho de sempre; Mariana, João, Ana Paula, Bruna, Jaqueline pelos ensinamentos compartilhados.

À toda a equipe de laboratório de hematologia do HC, às queridas Aglair, Denise, Ana Silvia, Bárbara, Adriana.

À Patrícia e Priscila pela disponibilidade e carinho de sempre na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

À Amélia e Josi pelos ensinamentos e ajuda na realização do PCR.

À Cleide pela disponibilidade e carinho no manejo com os animais.

Aos residentes que ajudaram na obtenção das amostras de medula óssea dos pacientes.

Aos docentes e professores pelos ensinamentos constantes.

Aos meus queridos amigos do hemocentro, Maria, Sarah, Lycia, Ana Luiza, Camilla, Dalvinha, Giselle, Ana Cristina, Gil e Benedito, e toda a equipe de enfermagem que muito colaborou na obtenção de amostras de pacientes e doadores.

Aos pacientes e doadores de medula óssea que concordaram voluntariamente em participar do estudo.

RESUMO

Leal, CT. Identificação da família BCL2 como alvo terapêutico no tratamento das neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação JAK2V617F [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2017. 116 f.

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) negativas para o rearranjo t(9;22)/BCR-ABL1, incluindo Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP), são doenças hematopoéticas clonais e estão frequentemente associadas à mutação JAK2V617F. Apesar dos avanços no conhecimento da fisiopatologia após a descoberta da mutação JAK2V617F e do desenvolvimento de inibidores da JAK2, o tratamento permanece não curativo. Sabe-se que as células-tronco mais primitivas nas NMPs são responsáveis pela iniciação da doença e que a expansão dos precursores mielóeritróides contribui para o fenótipo clínico. Dados recentes obtidos com ensaios *in vitro* mostram que as proteínas da família BCL2, reguladoras da apoptose mitocondrial, desempenham um papel relevante na patogênese das NMPs. Acreditamos que a expressão anômala de BCL2 nas células progenitoras hematopoéticas (CPH) das NMPs pode contribuir para a patogênese desse grupo de doenças. Avaliamos a expressão gênica, por meio de PCR em Tempo Real, da família BCL2 (genes antiapoptóticos BCL-xL e BCL2 e o pró-apoptótico BIM) nas diferentes subpopulações de progenitores hematopoéticos murinos (de um modelo condicional *knockin* de expressão heterozigótica condicional da Jak2^{V617F}) e de pacientes portadores de NMPs bem como sua contribuição para o fenótipo da doença e resposta aos inibidores da JAK2 (com a droga ruxolitinibe) e/ou inibição da família BCL2 (com o inibidor de BCL2 obatoclax). Não encontramos diferença de expressão basal dos genes *BCL2*, *BCL-xL* e *BIM* nas células CD34⁺ bem como nas subpopulações de células CD34⁺38^{-/+} de pacientes com NMPs, independente da presença da mutação JAK2V617F, em relação às células CD34⁺ e subpopulações CD34⁺38^{-/+} dos controles ($p > 0.05$). Nas células CD34⁺ de pacientes com TE encontramos aumento de expressão de *BCL2* em relação às células CD34⁺ pacientes com MFP ($p = 0.03$). No modelo transgênico de camundongos Jak2 wt/VF (que apresentam uma NMP semelhante à PV) e Jak2 wt/wt (controles), comparamos a expressão diferencial dos genes da família Bcl2 em precursores hematopoéticos imaturos (LSKs) e progenitores mielóides mais maduros (MPs). A expressão do *Bcl-xL* em MPs de camundongos wt/VF foi maior em relação à subpopulação de células LSKs e em relação às duas subpopulações de células dos controles ($p = 0.0011$). Não houve diferença significativa de expressão do *Bcl2* nas subpopulações de células LSKs e MPs de animais wt/VF e wt/wt ($p = 0.12$). Observou-se menor expressão de *Bim* em LSKs em relação às células MPs dos animais mutados ($p = 0.026$), diferença essa não observada entre os controles Jak2 wt/wt. O tratamento isolado com inibidor de JAK2 ou de BCL2 resultou em aumento de expressão do *Bim* nas CPH (LSKs e MPs) de camundongos Jak2 wt/VF em relação aos animais Jak2 wt/wt. Este aumento da expressão de *Bim* foi ainda mais evidente após o tratamento das células com a combinação das duas drogas quando comparadas às células não tratadas ou tratadas com um dos dois inibidores, sendo maior em animais doentes do que em animais controles ($p < 0.0001$). A análise do efeito do tratamento com os inibidores de JAK2 e BCL2 na indução de apoptose por meio de citometria de fluxo (marcação com anexina/7-AAD) revelou que as células LSKs foram mais resistentes à apoptose tardia

do que as células MPs independentemente da mutação da JAK2 ($p<0.05$). O tratamento com obatoclax resultou em indução de apoptose diferentemente do que foi observado com o tratamento com ruxolitinibe ($p=0.594$) nas células MPs de animais Jak2 wt/VF. Ademais, o tratamento combinado com ruxolitinibe e obatoclax resultou no aumento da apoptose nas células MPs dos animais com fenótipo de PV (Jak2 wt/VF) em relação aos animais Jak2 wt/wt ($p=0.05$). Em conclusão, demonstramos que a resistência à apoptose nas NMPs ocorre desde as CPH iniciadoras da doença. Nossos resultados sugerem que a modulação da apoptose mitocondrial pode ser uma nova estratégia terapêutica para pacientes com NMP em combinação aos inibidores de JAK2, na medida em que atua tanto nas CPH que iniciam a doença como nos MPs, responsáveis pelos sinais e sintomas de mieloproliferação.

Palavras-chave: neoplasias mieloproliferativas, apoptose, BCL2, inibidor de BCL2, inibidor da JAK2.

ABSTRACT

Leal, CT. BCL2 family as potential therapeutical targets in the treatment of JAK2V617F- associated myeloproliferative neoplasms [dissertation]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2017. 116 f.

Myeloproliferative Neoplasms (MPNs) negative for t(9;22)/*BCR-ABL1* rearrangement, including Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (PMF), are clonal hematopoietic diseases and are often associated with the JAK2V617F mutation. Despite advances in the pathophysiology knowledge after the discovery of the JAK2V617F mutation and the development of JAK2 inhibitors, treatment remains non-curative. It is known that MPN primitive stem cells are essential for the initiation of the disease and that the expansion of the myeloeritroid precursors contributes to the clinical phenotype. Recent data, obtained with *in vitro* assays, showed that BCL2 family proteins, regulators of mitochondrial apoptosis, play a relevant role in the pathogenesis of MPNs. We believe that the anomalous expression of BCL2 in hematopoietic progenitor cells (HPCs) of MPNs may contribute to their pathogenesis. We evaluated BCL2 family (antiapoptotic genes *BCL-xL* and *BCL2* and the pro-apoptotic *BIM*) gene expression by real-time PCR in different subpopulations of hematopoietic progenitors from a conditional Jak2V617F *knockin* murine model and from patients with MPNs as well as their contribution to the disease phenotype and response to JAK2 inhibitors (with ruxolitinib) and/or to the inhibition of the BCL2 family (with the BH3-mimetic obatoclax). We found no difference in the basal expression of the *BCL2*, *BCL-xL* and *BIM* in CD34⁺ cells as well as in subpopulations of CD34⁺ 38^{-/+} cells from patients with MPNs, regardless of the presence of the JAK2V617F mutation. In CD34⁺ cells obtained from patients with ET, we found an increase of *BCL2* expression when compared to CD34⁺ cells with PMF ($p=0.03$). In the Jak2 wt/VF transgenic mice (that develop a MPN similar to PV) and Jak2 wt/wt controls, we compared the differential expression of *Bcl2* family genes in immature hematopoietic precursors (LSKs) and more mature myeloid progenitors (MPs). Expression of *Bcl-xL* in MPs of wt/VF mice was greater when compared to LSKs and to the two progenitor subpopulations of control cells ($p=0.0011$). There was no significant difference in *Bcl2* expression between the subpopulations of LSKs and MPs from wt/VF and wt/wt animals ($p=0.12$). Lower *Bim* expression in LSKs than in MPs was observed in samples from JAK2-mutated animals ($p=0.026$). Such difference was not observed between the Jak2 wt/wt subpopulations. Treatment with JAK2 or BCL2 inhibitors alone resulted in increased *Bim* expression in LSKs and MPs of the Jak2 wt/VF mice when compared to Jak2 wt/wt animals. This increase in *Bim* expression was even more evident when these cells were treated with the combination of the two drugs as compared to single treatment with one of the two inhibitors, being higher in mutated than control animals ($p<0.0001$). The analysis of apoptosis by flow cytometry (annexin / 7-AAD labeling) revealed that LSK cells were more resistant to late apoptosis than MP cells regardless of the JAK2 mutation ($p<0.05$). Treatment with obatoclax resulted in greater apoptosis induction than it was observed with ruxolitinib treatment ($p=0.594$) on MP cells of Jak2 wt/VF animals. In addition, the combined treatment with ruxolitinib and obatoclax resulted in increased apoptosis in MP cells of animals with the PV phenotype (Jak2 wt/VF) as compared to the Jak2 wt/wt animals ($p=0.05$). In conclusion, we demonstrated that resistance to apoptosis in MPNs occurs at the level of the hematopoietic progenitors that initiate the disease. Our results suggest that modulation

of mitochondrial apoptosis may be a new therapeutic strategy for MPN patients in combination with JAK2 inhibitors, as it acts on both the disease initiating and more mature progenitors, responsible for the clinical findings of myeloproliferation.

Keywords: myeloproliferative neoplasms, apoptosis, BCL2, BCL2 inhibitor, JAK2 inhibitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.	Esquema representativo do papel das diversas populações de precursores hematopoéticos na patogênese das neoplasias mieloproliferativas	25
FIGURA 2.	Via intrínseca e extrínseca da apoptose.....	28
FIGURA 3.	Caracterização imunofenotípica das populações de células-tronco hematopoéticas (CD34 ⁺ CD38 ⁻) e progenitores multipotentes (CD34 ⁺ CD38 ⁺) a partir de suspensões de células da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas.....	38
FIGURA 4.	Caracterização imunofenotípica das populações de células-tronco hematopoéticas (CD34 ⁺ CD38 ⁻) e progenitores multipotentes (CD34 ⁺ CD38 ⁺) a partir de suspensões de células da medula óssea de doadores saudáveis	39
FIGURA 5.	Representação esquemática da geração do modelo transgênico <i>knockin</i> Jak2 ^{V617F}	44
FIGURA 6.	Ilustração da genotipagem para a presença do alelo <i>Jak2</i> mutado e <i>vav-Cre</i> no modelo murino Jak2 ^{V617F}	47
FIGURA 7.	Ilustração da expressão <i>Jak2</i> wt e da <i>Jak2</i> V617F por meio de PCR em Tempo Real nos vários genótipos possíveis da colônia Jak2/ <i>vav-Cre</i>	47
FIGURA 8.	Viabilidade celular após o tratamento <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de inibidor de BCL2, obatoclax, em (veículo, 25, 100, 250, 500 e 1000nM) e inibidor de Jak1/2, ruxolitinibe, (veículo, 30, 100, 300, 600 e 1000nM) de células da medula óssea de animais Jak2 wt/VF avaliado pelo ensaio de MTT	54
FIGURA 9.	Curva dose-efeito das drogas obatoclax e ruxolitinibe sobre a viabilidade de células da medula óssea de animais portadores da mutação Jak2 ^{V617F}	55
FIGURA 10.	Estratégia de <i>gates</i> utilizada para análise de apoptose com a marcação com anexina V e 7-AAD.....	58
FIGURA 11.	Imagem representativa do tamanho do baço de animais Jak2 ^{V617F} (wt/VF) em comparação aos controles (wt/wt) .	67

FIGURA 12.	Características clínico-laboratoriais de animais transgênicos Jak2 wt/VF (policitemia vera) e Jak2 wt/wt (controle) em relação à Hemoglobina (Hb, g/dL), Hematocrito (Ht, %), Glóbulos brancos (Gb, 1000/ μ L), Plaquetas (1000/ μ L) e peso do baço (gramas)	68
FIGURA 13.	Análise representativa da caracterização imunofenotípica das populações de células-tronco hematopoéticas e progenitores multipotentes da medula óssea de animais Jak2 wt/wt (+/+, controles) e Jak2 wt/VF (+/VF, policitemia vera)	69
FIGURA 14.	Expressão gênica em células CD34 ⁺ da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (PV, Policitemia Vera; TE, Trombocitemia essencial e MFP, Mielofibrose primária) associadas à mutação JAK2 ^{V617F} em relação aos controles normais.....	70
FIGURA 15.	Expressão dos genes <i>BCL-xL</i> , <i>BCL2</i> e <i>BIM</i> por PCR em Tempo Real em células CD34 ⁺ da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (PV, Policitemia Vera; TE, Trombocitemia essencial e MFP, Mielofibrose primária) em relação aos controles normais (CT)	71
FIGURA 16.	Expressão dos genes <i>BCL-xL</i> , <i>BCL2</i> e <i>BIM</i> por PCR em Tempo Real em células CD34 ⁺ da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (PV, Policitemia Vera; TE, Trombocitemia essencial e MFP, Mielofibrose primária) associadas à mutação da JAK2 ^{V617F} em relação às subpopulações de pacientes não portadores da mutação V617F (JAK2 ^{WT}) e controles normais (CT).	72
FIGURA 17.	Expressão dos genes <i>BCL-xL</i> , <i>BCL2</i> e <i>BIM</i> por PCR em Tempo Real em subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas (CD34 ⁺ CD38 ⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34 ⁺ CD38 ⁺) da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (PV, Policitemia Vera; TE, Trombocitemia essencial e MFP, Mielofibrose primária) em relação aos controles normais (CT).....	74
FIGURA 18.	Expressão dos genes <i>BCL-xL</i> , <i>BCL2</i> e <i>BIM</i> por PCR em Tempo Real em subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas (CD34 ⁺ CD38 ⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34 ⁺ CD38 ⁺) da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2 ^{V617F} em relação às subpopulações de pacientes não portadores da mutação V617F (JAK2 ^{WT}) e controles normais (CT)	75

FIGURA 19.	Expressão dos genes <i>BCL-xL</i> , <i>BCL2</i> e <i>BIM</i> por PCR em Tempo Real em subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas (CD34 ⁺ CD38 ⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34 ⁺ CD38 ⁺) da medula óssea de pacientes com Policitemia vera não portadores da mutação V617F (JAK2 ^{WT}) em relação aos controles (CT).....	77
FIGURA 20.	Expressão dos genes <i>BCL-XI</i> , <i>BCL2</i> e <i>BIM</i> por PCR em Tempo Real em subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas (CD34 ⁺ CD38 ⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34 ⁺ CD38 ⁺) da medula óssea de pacientes com Mielofibrose primária associadas ou não à mutação JAK2 ^{V617F} e controles normais (CT)	78
FIGURA 21.	Expressão dos genes <i>Bcl-xL</i> , <i>Bcl2</i> e <i>Bim</i> por PCR em Tempo Real em células da medula óssea dos camundongos Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt (controle)	79
FIGURA 22.	Expressão dos genes <i>Bcl-xL</i> , <i>Bcl2</i> e <i>Bim</i> por PCR em Tempo Real em células hematopoéticas precursoras imaturas (LSKs) e precursores mieloides mais maduros (MPs) dos camundongos Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt (controle)	81
FIGURA 23.	Expressão dos genes <i>Bcl-xL</i> e <i>Bim</i> , em células precursoras hematopoéticas dos camundongos Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt (controle, CT) submetidas ao tratamento com veículo (V, DMSO), inibidor de JAK1/2 (ruxolitinibe 300nM) e/ou droga BH3-símile (obatoclax 250nM)	83
FIGURA 24.	Avaliação de apoptose tardia	86
FIGURA 25.	Avaliação de apoptose precoce	88
FIGURA 26.	Ensaio de formação de colônia	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	<i>Primers</i> e sequências usadas na determinação da expressão dos genes da família BCL2 em pacientes e controles.....	42
TABELA 2.	<i>Primers</i> e sequências usadas para genotipagem dos animais transgênicos.....	44
TABELA 3.	Programa utilizado para as reações de genotipagem por PCR.....	45
TABELA 4.	<i>Primers</i> e sequências usadas na determinação da expressão dos genes da família BCL2 nos animais transgênicos.....	53
TABELA 5.	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas incluídos no estudo (2014-2016)	63
TABELA 6.	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas incluídos no estudo das subpopulações de células (2014-2016).....	64
TABELA 7.	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas do HCFMRP (2007-2016)..	65
TABELA 8.	Características clínicas e laboratoriais do modelo murino Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCL2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
cDNA	DNA complementar
CALR	Calreticulina
CPH	Células progenitoras hematopoéticas
CTH	Células tronco hematopoéticas
CTL	Células-tronco leucêmicas
DIPSS	<i>Dynamic International Prognostic Scoring System</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
LSK	Células tronco hematopoéticas <i>Lin⁻ Sca-1⁺, ckit^{hi}</i>
LT-HCS	<i>Long-term hematopoietic stem cells</i>
LMC	Leucemia mieloide crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
MFP	Mielofibrose Primária
MP	Progenitores mieloeritroides
MTT	Metil tiazol tretazólio
NMP	Neoplasia mieloproliferativa
NTC	<i>No template control</i>
PBS	<i>Fosfate buffered saline</i>
PV	Policitemia vera
REDOME	Registro nacional de doadores de medula óssea

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
SBF	Soro fetal bovino
SCF	<i>Stem cell factor</i>
shRNA	<i>Short-hairpin RNA</i>
TE	Trombocitemia Essencial
WHO	<i>World health organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2 ^{V617F}	18
1.2 Papel diferencial dos precursores hematopoéticos na gênese e manutenção das neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2 ^{V617F}	24
1.3 Família BCL2, apoptose e neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2 ^{V617F}	26
1.4 Inibição de BCL2 como estratégia para erradicação de células-tronco neoplásicas	30
 2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	32
 3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Aspectos éticos da pesquisa	35
3.2 Modelo Humano	35
3.2.1 Seleção de pacientes e controles.....	35
3.2.2 Processamento das amostras	36
3.2.3 Isolamento de células precursoras hematopoéticas humanas por meio de citometria de fluxo	37
3.2.4 Extração de RNA.....	39
3.2.5 Transcrição em cDNA	41
3.2.6 PCR em tempo real para determinação da expressão dos genes da família BCL2	40
3.2.7 Pesquisa da mutação da JAK2 ^{V617F} e calreticulina.....	42
3.3 Modelo Murino.....	43
3.3.1 Obtenção do modelo murino transgênico <i>knockin</i> Jak2 ^{V617F}	43
3.3.2 Genotipagem do modelo murino transgênico.....	46
3.3.3 Caracterização das subpopulações de progenitores hematopoéticos dos animais Jak2 wt/VF	48
3.3.4 Isolamento das subpopulações de progenitores murinos hematopoéticos Jak2 ^{V617F} e controles	48
3.3.5 Cultura de células progenitoras hematopoéticas murinas Jak2 ^{V617F} e controles	49
3.3.6 Extração de RNA.....	49
3.3.7 Transcrição em cDNA	50
3.3.8 PCR em Tempo Real para determinação da expressão dos genes da família BCL2	51
3.3.9 Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)	52

3.3.10 Avaliação de apoptose	55
3.3.11 Ensaio de formação de colônia	58
4 RESULTADOS.....	59
4.1 Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com NMP incluídos no estudo	59
4.2 Caracterização fenotípica dos animais transgênicos Jak2 ^{V617F} e controles ...	65
4.3 Expressão gênica.....	69
4.3.1 Expressão gênica diferencial dos genes <i>BCL-xL</i> , <i>BCL2</i> e <i>BIM</i> em células progenitoras hematopoéticas (CD34 ⁺), células precursoras hematopoéticas imaturas (CD34 ⁺ CD38 ⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34 ⁺ CD38 ⁺) de pacientes portadores de NMP e controles	69
4.3.2 Expressão diferencial dos genes <i>Bcl-xL</i> , <i>Bcl2</i> e <i>Bim</i> em células progenitoras hematopoéticas murinas Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt	78
4.4 Avaliação de apoptose	83
4.5 Ensaio de formação de colônias	88
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS	110
ANEXO A - Parecer do comitê de ética em seres humanos	110
ANEXO B - Parecer do comitê de ética em animais	111
ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido controle	112
ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido paciente.....	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2^{V617F}

As neoplasias mieloproliferativa (NMPs) negativas para o rearranjo t(9;22)/BCR-ABL1, incluindo as entidades Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP) são doenças hematopoéticas originadas de alteração clonal da célula-tronco hematopoética e caracterizadas por proliferação de precursores mieloides da medula óssea com consequente produção excessiva de uma ou mais linhagens de células maduras mieloides do sangue periférico. Em conjunto, a incidência anual das NMPs acima citadas é de 0.5 a 2.5 casos por 100.000 habitantes. Clinicamente, essas doenças caracterizam-se por graus variados de eritrocitose, trombocitose, leucocitose, organomegalia secundária à hematopoese extramedular, trombose e hemorragia. Num estágio tardio, esta mieloproliferação descontrolada pode resultar em mielofibrose grave e transformação para leucemia aguda (Vardiman *et al.*, 2009).

A Policitemia Vera caracteriza-se por panmielose da medula óssea e aumento da produção de células da linhagem eritróide de maneira independente aos mecanismos que normalmente regulam a eritropoese. A incidência é de 0.84 casos por 100.000 habitantes ao ano. Ocorre mais frequentemente na quinta ou sexta décadas de vida e há discreta predominância da doença no sexo masculino (Vardiman *et al.*, 2009; Titmarsh *et al.*, 2014; Tefferi e Barbui, 2017). Além da elevação na contagem de hemácias, hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht), os pacientes podem apresentar leucocitose às custas de neutrofilia e trombocitose. O cariótipo da medula óssea não apresenta anormalidades específicas mas pode estar alterado em 10 a

20% dos casos. Os pacientes são frequentemente assintomáticos ou apresentam queixas relacionadas à esplenomegalia, prurido ou trombozes arteriais ou venosas. Durante a evolução da doença, além da ocorrência de eventos trombóticos (12% arteriais e 9% venosos), pode ocorrer evolução para mielofibrose pós-policitêmica (9%). A transformação para leucemia mieloide aguda foi estimada em menos de 10% em 20 anos. (Passamonti, 2012; Tefferi *et al.*, 2013; Tefferi, 2016a; Tefferi e Barbui, 2017).

A Trombocitemia Essencial, como as demais NMPs, origina-se ao nível da célula-tronco hematopoética, mas envolve primariamente a linhagem megacariocitária. Caracteriza-se por trombocitose sustentada no sangue periférico, aumento do número de megacariócitos maduros e grandes na medula óssea, e, clinicamente, por episódios de trombose, sangramentos ou fenômenos vasomotores. O risco de transformação para leucemia mieloide aguda é menor que 5% em 20 anos (Vardiman *et al.*, 2009; Tefferi *et al.*, 2013; Tefferi, Guglielmelli, Larson, *et al.*, 2014; Tefferi e Barbui, 2017).

A Mielofibrose Primária se caracteriza por proliferação predominante da série megacariocítica (megacariócitos atípicos) e granulocítica associada a algum grau de fibrose da medula óssea e hematopoese extramedular. A doença manifesta-se clinicamente com esplenomegalia, hepatomegalia (menos comum) e sintomas constitucionais. O hemograma pode mostrar desde leucopenia e/ou trombocitopenia a leucocitose e/ou trombocitose, além de vários graus de anemia, as quais podem se associar ou não, à reação leucoeritroblástica e à presença de dacriócitos. Dentre as neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR-ABL1* negativas é a que apresenta o pior prognóstico, o qual depende de vários fatores prognósticos tais como: idade, hemoglobina, sintomas constitucionais, blastos circulantes, contagem de leucócitos e de plaquetas e anormalidades cariotípicas. A morbidade e mortalidade da doença

decorrem de insuficiência cardíaca, hipertensão portal, infecções, sangramentos, eventos trombóticos ou transformação para leucemia aguda, a qual ocorre em até 20% dos casos (Vardiman *et al.*, 2009; Tefferi, Guglielmelli, Larson, *et al.*, 2014; Tefferi, 2016b).

As NMPs estão associadas à presença de uma mutação somática na proteína Janus Kinase 2 (JAK2). A JAK2 é uma tirosinoquinase citoplasmática associada com domínios intracelulares de receptores de fatores de crescimento incluindo a eritropoetina. A mutação no éxon 14, descrita em 2005, está localizada no domínio regulatório ou pseudoquinase da proteína JAK2 e consiste na substituição de uma valina por fenilalanina na posição 617 (V617F), causando ativação de vias de sinalização do receptor de eritropoetina independente da presença do ligante (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). A mutação JAK2^{V617F} foi identificada em mais de 95% dos pacientes com PV e em cerca de 50-60% dos pacientes com TE e MFP (Tefferi, 2016b; Tefferi e Barbui, 2017). Estudos subsequentes identificaram mutações somáticas da via JAK-STAT nas NMPs JAK2^{V617F}-negativa, mais comumente no éxon 12 da proteína JAK2, no gene calreticulina (CALR), presente em 40 a 70% dos casos de TE e MFP negativas para a mutação JAK2 e no receptor da trombopoietina (MPLW515L no éxon 10; presente em menos de 5% dos pacientes com TE e de 6 a 7% dos pacientes com MFP) (Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Yilmaz *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007; Pietra *et al.*, 2008; Delhommeau *et al.*, 2010; Klampfl *et al.*, 2013; Milosevic e Kralovics, 2013; Nangalia *et al.*, 2013; Rumi *et al.*, 2014; Tefferi, Guglielmelli, Lasho, *et al.*, 2014; Tefferi e Pardanani, 2014; Park *et al.*, 2015; Cazzola, 2016; Tefferi, 2016a). Recentemente, outras mutações em LNK e modificadores epigenéticos, como TET2, ASXL1, EZH2, DNMT3A e IDH1/2, foram descritas na patogênese das

NMP e também são alvos de estudos dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas NMPs e podem exercer impacto nos vários fenótipos associados às NMPs bem como em sua evolução (James *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2010; Tefferi, 2010; Klampfl *et al.*, 2013; Tefferi *et al.*, 2013; Titmarsh *et al.*, 2014; Tefferi, 2016b; a; Meyer, 2017; Tefferi e Barbui, 2017).

A ativação constitucional que ocorre na via JAK-STAT em pacientes com NMPs, independente do status mutacional, confere uma vantagem proliferativa à célula-tronco maligna e resistência à apoptose celular, levando à mieloproliferação. Além da ativação da via JAK-STAT, há evidências de que tanto as células-tronco neoplásicas como células do nicho da medula óssea secretam citocinas (tais como TGF β , FGF, VEGF, PDGF, osteocalcina e osteoprotegerina) que desencadeiam alterações no microambiente, tais como aumento da densidade microvascular (angiogênese), fibrose e espessamento das trabéculas ósseas, achados típicos das NMPs e que podem contribuir para o fenótipo e a progressão da doença. De fato, pacientes com NMPs têm níveis circulantes significativamente elevados de citocinas pró-inflamatórias, o que parece estar associado à menor sobrevida nos pacientes com MFP e contribuir para os sintomas constitucionais, fibrose medular, hematopoese extramedular e progressão da doença. (Lataillade *et al.*, 2008; Klampfl *et al.*, 2013; Tefferi, Guglielmelli, Larson, *et al.*, 2014; Tefferi, Guglielmelli, Lasho, *et al.*, 2014; Tefferi, 2016b; a).

O tratamento convencional para PV, TE ou MFP com quimioterapia citorredutora, prevenção de eventos trombóticos ou flebotomia (esta última no caso da PV), embora alivie os sintomas da doença, não é curativo ou reduz o potencial de evolução clonal para mielodisplasia ou leucemia aguda (Fruchtman *et al.*, 1997; Levine e Gilliland, 2008; Beer *et al.*, 2011; Komrokji *et al.*, 2012; John Mascarenhas, 2013; Ronald Hoffman, 2013; Cervantes, 2014; Vannucchi, 2014; Tefferi, 2016b; a;

Tefferi e Barbui, 2017). A descoberta da mutação JAK2^{V617F} representa, sem dúvida, um grande avanço para o estudo das NMPs, tendo contribuído para o diagnóstico dos pacientes bem como para o desenvolvimento de drogas inibidoras da JAK2.

Vários inibidores da JAK2 foram desenvolvidos e testados clinicamente para pacientes com MFP e mais recentemente na PV. Kleppe e colaboradores demonstraram que a inibição de JAK1/2 leva a uma rápida e potente redução nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, consistente com os benefícios clínicos observados com a terapia com inibidores de JAK e demonstraram que este é um efeito direto da inibição da sinalização de JAK-STAT, presente em células com ou sem a mutação JAK2 (Kleppe *et al.*, 2015).

Apesar de não ter se mostrado capaz de modificar a evolução natural da doença, o inibidor da JAK1/2 ruxolitinibe se mostrou superior às terapias convencionais para controle sintomático da MFP, independentemente da presença da mutação da JAK2. Nos dois estudos fase III comparando ruxolitinibe com placebo (COMFORT I) e ruxolitinibe com a melhor terapia disponível (COMFORT II), a droga demonstrou redução rápida e duradoura da esplenomegalia e melhora significativa dos sintomas constitucionais. Além disso, a análise combinada dos dois estudos mostrou benefício de sobrevida para pacientes de risco intermediário-2 ou alto risco, após cerca de 3 anos de seguimento. No estudo COMFORT II, a redução da esplenomegalia foi observada em 28.5% dos pacientes usando esta droga em comparação a outros tratamentos. O ruxolitinibe foi aprovado para uso clínico em casos de MFP, de risco intermediário-2 ou alto risco, mielofibrose pós-policitemia vera ou pós-trombocitemia essencial, nos quais o TMO alogênico não pode ser realizado e que apresentem sintomas constitucionais e/ou esplenomegalia graves, desde que essa medicação esteja disponível e não haja contra-indicações (Quintás-Cardama *et al.*, 2010; Verstovsek *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2012; Verstovsek *et al.*, 2012; Cervantes,

2014; Guglielmelli *et al.*, 2014; Vannucchi, Kantarjian, *et al.*, 2015; Verstovsek *et al.*, 2015; Tefferi, 2016b). Mais recentemente, após estudo fase III que comparou o uso de ruxolitinibe com a melhor terapia disponível para pacientes com PV, este foi aprovado para os pacientes intolerantes ou resistentes à hidroxiuréia devido ao seu potencial em aliviar significativamente os sintomas constitucionais e reduzir a esplenomegalia (Vannucchi, Kiladjian, *et al.*, 2015; Tefferi e Barbui, 2017).

Entretanto, a droga não é isenta de efeitos colaterais a curto e longo prazo e não se mostrou capaz de agir ao nível da célula-tronco iniciadora da doença ou de mudar a sua história natural. Os efeitos adversos não são desprezíveis (trombocitopenia ocorreu em 44.5% *versus* 9.6%, anemia em 40.4% *versus* 12.3% e diarreia em 24% *versus* 11% nos pacientes que usaram ruxolitinibe *versus* a melhor terapia disponível, respectivamente, no estudo COMFORT II) (Harrison *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2015; Vannucchi, Kantarjian, *et al.*, 2015; Vannucchi, Kiladjian, *et al.*, 2015; Tefferi, 2016b; Miller *et al.*, 2017; Tefferi e Barbui, 2017). Deve-se atentar ainda para a ocorrência de uma síndrome de retirada grave com a descontinuação do ruxolitinibe (caracterizada por recaída dos sintomas prévios ao uso, esplenomegalia progressiva, piora das citopenias e descompensação hemodinâmica ocasional) e a falha no tratamento a longo prazo relacionada ao crescimento de células resistentes ao tratamento com monoterapia (Quintás-Cardama *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2012; Verstovsek *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 2013; Guglielmelli *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2015; Vannucchi, Kantarjian, *et al.*, 2015; Vannucchi, Kiladjian, *et al.*, 2015; Verstovsek *et al.*, 2015; Tefferi, 2016b; Meyer, 2017; Miller *et al.*, 2017; Tefferi e Barbui, 2017).

Estes achados dos estudos clínicos são consistentes com um estudo recente em um modelo murino de mutação da Jak2, no qual a inibição da JAK2 falhou em eliminar a população de células-tronco iniciadoras das NMP. Nesse modelo, por meio

de transplante seriado de células-tronco hematopoéticas (Lin⁻ Sca-1⁺, ckit^{hi}, LSKs) provenientes de animais portadores da Jak2^{V617F} e tratados por seis semanas com um inibidor seletivo da JAK2, em receptores secundários letalmente irradiados, observou-se reconstituição hematopoética completa com elevação do hematócrito três semanas após injeção das LSKs dos animais primários (Jamieson *et al.*, 2006; Mullally *et al.*, 2010). Portanto, embora a JAK2 seja o principal alvo terapêutico conhecido até o momento, um melhor entendimento acerca dos seus mecanismos de indução de apoptose bem como da sua ação diferencial nas diversas subpopulações de células progenitoras das NMP associadas à JAK2^{V617F} é necessário e pode levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas menos tóxicas e mais eficientes.

1.2 Papel diferencial dos precursores hematopoéticos na gênese e manutenção das neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2^{V617F}

Os modelos de estudo da patogênese da PV nos permitem concluir que a mutação JAK2^{V617F} ocorre nas células-tronco hematopoéticas (CTHs), enquanto os precursores mieloide-eritroides expandem, resultando em excessiva produção das hemácias do sangue periférico. De fato, num modelo murino de PV, demonstrou-se que as CTH portadoras da Jak2^{V617F} mais imaturas (LT-HCS, do inglês, *long-term hematopoietic stem cells*) são responsáveis pela iniciação e manutenção da doença *in vivo* e atingem clonalidade, dominando a hematopoese ao longo do tempo. Em contrapartida, a expressão da Jak2^{V617F} em precursores eritróides leva a uma doença com fenótipo muito atenuado em relação ao primeiro (Mullally *et al.*, 2012). Esses dados nos levam a inferir que as diversas populações de precursores hematopoéticos têm papéis distintos na patogênese das NMPs, sendo que as CTHs mais primitivas iniciariam a doença e os

precursores mieloides e seus derivados eritrocitários, granulocitários e megacariocitários têm um papel relevante na expansão e determinação do fenótipo da doença (Figura 1). Dessa forma, a caracterização detalhada dessas subpopulações bem como a sua expressão gênica diferencial poderia contribuir não apenas para complementar as informações conhecidas sobre a patogênese desse grupo de doenças, mas também para elucidar os mecanismos de inibição diferencial dessas populações pelas drogas disponíveis e em estudo.

Figura 1. Esquema representativo do papel das diversas populações de precursores hematopoéticos na patogênese das neoplasias mieloproliferativas. As células-tronco hematopoéticas mais primitivas iniciam a doença e os precursores mieloides e seus derivados eritrocitários, granulocitários e megacariocitários têm um papel relevante na expansão e determinação do fenótipo da doença. A caracterização diferencial dessas subpopulações quanto à vantagem de sobrevivência mediada pela desregulação da família BCL2 pode contribuir para o entendimento da fisiopatologia bem como para otimizar o tratamento visando a erradicação das células iniciadoras da doença.

1.3 Família BCL2, apoptose e neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2^{V617F}

A apoptose celular pode ser iniciada por duas vias, intrínseca e extrínseca. A via intrínseca é ativada por vários mecanismos, como estresse oxidativo, infecção viral, lesão no DNA, privação de fatores de crescimento e é estritamente controlada pela família de proteínas da família BCL-2 (*B-cell lymphoma-2*). As proteínas da família BCL2 regulam a via intrínseca da apoptose mitocondrial e compreendem três subgrupos com base na estrutura e função: 1) proteínas pró-apoptóticas BAX e BAX-like, que permeabilizam a membrana mitocondrial externa e iniciam a ativação das caspases, 2) proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-xL, MCL-1, BCL-W, A1A), que inibem diretamente as proteínas pró-apoptóticas e 3) proteínas pró-apoptóticas tipo BH3-símile (BIM, BID, BAD, PUMA, HRK, BIK, NOXA), as quais desencadeiam apoptose por meio de ligação e antagonismo das proteínas antiapoptóticas, diminuindo consequentemente a inibição das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAX-like. Esta via conduz, predominantemente, à ativação de caspase-9 porém, em alguns tipos de células, a via intrínseca pode prosseguir na ausência de caspase-9 ou do seu fator de ativação de apoptose 1 (APAF1) (Adams, 2003; Adams e Cory, 2007; Youle e Strasser, 2008).

A via extrínseca é desencadeada por interação receptor-ligante. Os receptores, membros da família de receptores de fator de necrose tumoral (TNF), tal como Fas ou receptor de TNF-1 (TNFr1) contêm um domínio de morte intracelular, o qual podem recrutar e ativar a caspase-8 através do domínio de morte associado a Fas da proteína adaptadora (FADD, também conhecido como MOt1) na superfície celular. Este recrutamento provoca subsequente ativação de

caspases a jusante (efetoras), tais como caspase-3, -6 ou -7, sem qualquer envolvimento da família BCL-2. Em algumas células, mais notavelmente hepatócitos, a via extrínseca pode interceptar a via intrínseca através de caspase-8 mediada pela clivagem da proteína pró-apoptótica BH3-símile BID. A forma truncada na extremidade C terminal de BID (tBID) transloca para a mitocôndria e promove a ativação de caspases (caspase-9 -3, -6 e -7) através da via intrínseca. Nestas situações, a perda de BID ou hiperexpressão de BCL-xL inibe a morte celular. BAX e BAK induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa e a liberação subsequente de moléculas indutoras de apoptose (tais como o citocromo c) o que leva a ativação de caspases. Proteínas antiapoptóticas, tais como BCL2 e BCL-xL, inibem BAX e BAK. As proteínas BH3-símile inibem a expressão das proteínas BCL2 e permitem a oligomerização de BAX e BAK. A ativação direta de BAX e BAK por algumas proteínas BH3-símile (especificamente BIM, tBID e PuMA) pode ocorrer (Figura 2) (Adams, 2003; Adams e Cory, 2007; Youle e Strasser, 2008).

Figura 2. Via intrínseca e extrínseca da apoptose. A apoptose pode ser induzida por receptores de superfície celular, tais como Fas e receptor de fator de necrose tumoral-1 (TNFR1) (via extrínseca, direita), ou por vários agentes genotóxicos, insultos metabólicos ou sinais transcripcionais (via intrínseca, esquerda). A via intrínseca se inicia com a ativação da proteína BH3-símile o que resulta na inativação de alguns membros da família BCL2 e aumenta a expressão de BAX e BAK. Algumas proteínas BH3-símile, como BIM e PUMA, também podem ser capazes de ativar diretamente BAX e/ou BAK (linha pontilhada). BAX e BAK promovem a liberação de citocromo c e ruptura mitocondrial, o que leva à ativação de APAF1 e formação de apoptossoma com subsequente ativação de caspase-9 e -3. As caspases, por sua vez, clivam substratos que possuam resíduos de aspartato levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidios de membrana que irão sinalizar à fagocitose. A via extrínseca pode ativar diretamente a caspase-8. A família BCL2 regula a via intrínseca e pode modular a via extrínseca através da clivagem da BID. Adaptado de: YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 9, n. 1, p. 47, 2008.

A transcrição da proteína antiapoptótica BCL-xL é regulada por STAT3/5, mediadores de sinalização da JAK2. Demonstrou-se que BCL-xL tem elevada expressão em células eritróides de pacientes com PV (Silva *et al.*, 1998) e pode induzir a formação de colônias eritróides na ausência de eritropoetina (Garçon *et al.*, 2006).

Em contraste, a inibição de BCL-xL com inibidores de JAK2 ou RNA de interferência leva à apoptose em linhagens celulares portadoras da mutação JAK2^{V617F} (Gozgit *et al.*, 2008). MCL1 tem elevada expressão em CTH normais e é essencial para a manutenção de progenitores hematopoéticos (Opferman *et al.*, 2005).

A proteína BIM é regulada pelas vias de sinalização PI3K-AKT-FOXO3A e ERK1/2 MAPK, ambas ativadas pela ativação da JAK (Adams e Cory, 2007). Além disso, as proteínas BH3-*símile*, principalmente BIM, parecem ser mediadores comuns durante a apoptose induzida por inibidores de tirosina quinase como imatinibe (Kuroda *et al.*, 2006), gefitinibe (Costa *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2007) e inibidores de MEK (Cragg *et al.*, 2008).

Em um estudo brasileiro, observou-se aumento da expressão gênica de *A1*, *MCL-1*, *BIK* e *BID*, bem como, *A1*, *BCL-W* e *BAK* em células CD34⁺ totais de pacientes com TE e MFP respectivamente, enquanto os níveis de *BAX* e *BCL2* foram reduzidos em TE e MFP em relação aos controles, sugerindo que a desregulação da via intrínseca da apoptose pode ter um papel na fisiopatologia das NMPs (Tognon *et al.*, 2012).

Recentemente, Will e colaboradores demonstraram que a indução de apoptose induzida pela inibição da JAK2 em linhagens celulares de origem humana portadoras da mutação JAK2^{V617F} (HEL e SET-2) se correlacionou com aumento da expressão de BIM e redução da expressão de BCL-xL e MCL-1 tanto a nível de RNA mensageiro como protéico. Ademais, a repressão de *BIM* por meio de *short-hairpin* RNA (shRNA) levou à atenuação da apoptose induzida pela inibição da JAK2 e o tratamento com a droga BH3-*símile* ABT-737 foi capaz de reverter a resistência à apoptose nestas células (Will *et al.*, 2010).

Em concordância com esses resultados, Rubert e colaboradores demonstraram que a inibição das caspases em células e linhagens celulares de origem humana portadoras da mutação JAK2^{V617F} (pacientes com LMA secundária a TE ou MFP, SET-2 e MB-02, respectivamente), aumentou a expressão de BIM após a inibição de JAK2 e redução de MCL-1, além de BCL-xL (Rubert *et al.*, 2011).

Esses resultados, derivados de estudos com linhagens celulares portadoras de JAK2^{V617F} motivaram a investigação da expressão gênica e das proteínas da família BCL2 nas diferentes subpopulações de progenitores hematopoéticos murinos e humanos portadores de JAK2^{V617F} bem como sua contribuição para o fenótipo da doença e resposta aos inibidores da JAK2.

1.4 Inibição de BCL2 como estratégia para erradicação de células-tronco neoplásicas

Há evidências na literatura de que as proteínas antiapoptóticas da família BCL2 contribuem para a sobrevivência da célula-tronco e demais progenitores hematopoéticos por meio de inibição direta da permeabilização da membrana mitocondrial (Domen e Weissman, 2003; Milyavsky *et al.*, 2010). Na Leucemia Mieloide Crônica (LMC) associada ao rearranjo t(9;22)/*BCR-ABL1*, demonstrou-se recentemente, por meio de PCR em Tempo Real, que células-tronco leucêmicas (CTL) (definidas como CD34⁺CD38⁺Lin⁻) humanas de pacientes em crise blástica expressavam níveis significativamente maiores de *BCR-ABL*, *BCL2*, *MCL-1* e *BCL-xL*, do que CTL de pacientes em fase crônica, sugerindo um aumento de expressão gênica pró-sobrevivência durante a transformação para crise blástica. O mesmo estudo mostrou que o tratamento de CTL obtidas de crise blástica com sabutoclax, um pan-inibidor de BCL2,

sensibilizou estas células à ação do inibidor de tirosina quinase dasatinibe ao nível do nicho da medula óssea; e a combinação das duas drogas num modelo de xenotransplante foi capaz de reduzir a enxertia das CTL e prolongar a sobrevivência de animais serialmente transplantados (Goff *et al.*, 2013). Também em Leucemia Mieloide Aguda (LMA), um papel prognóstico foi atribuído para o perfil de propensão à apoptose dos mieloblastos avaliado por meio de um ensaio funcional de liberação do citocromo c, sugerindo que este “*priming*” mitocondrial para apoptose determina a resposta inicial à quimioterapia, recaída e necessidade de transplante de medula óssea (Vo *et al.*, 2012). Esses dados identificam a inibição de BCL2 como estratégia terapêutica adicional para o tratamento das neoplasias mieloproliferativas em sua fase aguda ou leucêmica.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

As NMPs se iniciam da transformação clonal da célula-tronco hematopoética, que adquire vantagem proliferativa, sem perder sua capacidade de diferenciação. Esta característica se transmite aos precursores mieloides mais maduros, responsáveis pelo fenótipo de mieloproliferação destas doenças. Considerando que a maioria das drogas disponíveis para tratamento atua na eliminação das células mieloides mais maduras, é necessário identificar possíveis alvos terapêuticos ao nível da CTH. Acreditamos que nas NMPs associadas ou não à mutação JAK2^{V617F}, doenças crônicas por definição, nas quais se consegue definir as diversas subpopulações de progenitores hematopoéticos, a investigação do perfil de propensão à sobrevida ou morte celular possa trazer novos conhecimentos quanto à estratégia de erradicação desses progenitores anormais, em especial da CTH que carrega o potencial iniciador da doença (Figura 1). Neste contexto, os estudos anteriores, derivados de ensaios com linhagens celulares portadoras de JAK2^{V617F}, motivaram a nossa investigação acerca da expressão gênica da família BCL2 nas diferentes subpopulações de progenitores hematopoéticos murinos e humanos portadores de JAK2^{V617F} bem como sua contribuição para o fenótipo da doença e resposta aos inibidores da JAK2.

Diante do exposto, objetivamos com este trabalho:

Objetivos gerais:

1. Verificar a expressão gênica diferencial de *BCL-xL* (*Bcl-xL*), *BCL2* (*Bcl-2*) e *BIM* (*Bim*), por meio de PCR em Tempo Real, em células da medula óssea de

- pacientes portadores de NMP e controles saudáveis bem como de camundongos transgênicos portadores da mutação Jak2V617F e controles Jak2WT;
2. Verificar a expressão gênica diferencial de *BCL-xL* (*Bcl-xL*), *BCL2* (*Bcl-2*) e *BIM* (*Bim*), por meio de PCR em Tempo Real, em células hematopoéticas precursoras imaturas (CD34⁺CD38⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34⁺CD38⁺) de pacientes portadores de NMP e controles saudáveis, bem como em células hematopoéticas precursoras imaturas (Linhagem negativas, Sca-1⁺ ckit^{hi}, LSKs) e precursores mieloides mais maduros (Linhagem negativas, Sca-1⁻ ckit^{hi}, MPs) murinos portadores ou não da mutação Jak2V617F, isolados a partir de *sorting*;
 3. Correlacionar a expressão gênica diferencial de *BCL-xL* (*Bcl-xL*), *BCL2* (*Bcl-2*) e *BIM* (*Bim*) com a presença da mutação da JAK2V617F em células primárias de pacientes e animais portadores de NMP;
 4. Avaliar os efeitos da inibição da JAK2 (com a droga ruxolitinibe) e da modulação da família BCL2 (com o inibidor de BCL2 obatoclax), isoladamente ou em combinação, em células precursoras hematopoéticas murinas de animais portadores da mutação Jak2V617F e animais controles (Jak2WT), sobre a expressão diferencial dos genes da família BCL2, indução de apoptose e potencial clonogênico.

Objetivos específicos:

5. Caracterizar a população de pacientes com NMP incluídos no estudo quanto aos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.

6. Caracterizar os animais transgênicos JAK2V617F em relação aos controles quanto aos dados clínicos e laboratoriais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para fins didáticos, a metodologia será descrita em duas seções: modelo humano e modelo murino.

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

Esta pesquisa e seus termos de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP, parecer CEP número: 829.340 - ANEXO A) e Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (parecer número: 161/2014 - ANEXO B).

3.2 Modelo Humano

3.2.1 Seleção de pacientes e controles

Foram coletadas amostras de medula óssea de 31 pacientes entre 18 e 86 anos, no período de Julho de 2014 a Julho de 2016, com indicação de realização de punção aspirativa de medula óssea para investigação diagnóstica inicial de NMP ou para avaliação da doença, em caso de diagnóstico prévio já confirmado de NMP, independente da presença da mutação JAK2^{V617F}, e na ausência de tratamento citorredutor. Os critérios de exclusão foram: tratamento atual de outra neoplasia e uso de terapia citorredutora ou imunossupressora à época do exame. Para o diagnóstico, foi empregada a Classificação da Organização Mundial de Saúde revisada em 2008

(Vardiman *et al.*, 2009) no início da coleta de dados. Entretanto, após a publicação da Classificação revisada das neoplasias mieloides em 2016, os diagnósticos foram revisados segundo os critérios mais atuais (Arber *et al.*, 2016).

Amostras de medula óssea de doadores saudáveis (n=12) ou com doenças crônicas sem anormalidades hematológicas (n=2), submetidos à punção de medula óssea, foram coletadas *in situ* ou por aférese. Os doadores foram avaliados clinicamente pela equipe de Transplante de Medula Óssea do HCFMRP ou serviço vinculado ao Registro nacional de doadores de medula óssea (REDOME). Os controles e pacientes foram incluídos no estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (ANEXOS C e D, respectivamente).

Foram levantados os seguintes dados baseados na revisão de prontuário: idade, sexo, parâmetros hematimétricos ao diagnóstico, presença de visceromegalias (exame físico ou de imagem), necessidade transfusional, sangramentos, complicações tromboembólicas, presença da mutação JAK2^{V617F} e das mutações da calreticulina, cariótipo e estratificação de risco de acordo com a doença em questão (PV, TE ou MFP).

3.2.2 Processamento das amostras

Células mononucleares da medula óssea de pacientes portadores de NMP e controles foram isoladas por gradiente de densidade de centrifugação com *Ficoll-Hypaque* (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha). Foi realizada a análise de viabilidade celular em câmara de *Neubauer* e/ou contagem automatizada no aparelho *Coulter*® *T-890*. Estas células foram submetidas ao processo de congelamento e/ou lisadas

com o reagente Trizol para armazenamento e utilização posterior. As amostras de células mononucleares foram armazenadas e congeladas a -80°C , em solução de congelamento constituída de soro bovino fetal (SBF, Gibco BRL, UK) contendo 10% do agente criopreservante DMSO. Um total de $3-5 \times 10^6$ células foram ressuspensas em 250 μL de PBS 1X (do inglês, *fosfate-buffered saline*) com DEPC (Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e lisadas com 750 μL de TRIZOL (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e mantidas em freezer a -80°C para posterior extração de RNA.

Posteriormente, para uso das células congeladas, utilizou-se técnica de descongelamento padrão, em banho maria a 37°C , utilizando-se o meio RPMI1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) suplementado com 10% de SBF. Quando possível, foi utilizada a suspensão celular fresca, após o isolamento das células mononucleares em gradiente de densidade de centrifugação, já descrito previamente.

3.2.3 Isolamento de células precursoras hematopoéticas humanas por meio de citometria de fluxo

Após a separação das células mononucleares, estas foram marcadas com anticorpos CD34-PE (clone 581, BD Biosciences), CD45-FITC (clone 2D1 BD Biosciences) e CD38-APC (clone HIT2, BD Biosciences) e incubadas por 20 minutos no escuro, a 4°C . As subpopulações de células hematopoéticas mais imaturas ($\text{CD34}^+\text{CD38}^-$) e progenitores hematopoéticos mielóeritroides ($\text{CD34}^+\text{CD38}^+$) foram obtidas após a realização de *sorting* em tampão PBS 1X. Imediatamente após o

sorting, as suspensões celulares foram lisadas em TRIZOL para os ensaios de expressão gênica.

O *sorting* foi realizado no citômetro de fluxo JSAN (JSAN) e a análise realizada utilizando-se o *software* FlowJo v.9.6.3.

As figuras 3 e 4 ilustram a análise representativa da caracterização imunofenotípica das populações $CD34^+CD38^-$ (contendo as células-tronco hematopoéticas) e progenitores multipotentes ($CD34^+CD38^+$) a partir de suspensões de células da medula óssea de pacientes com NMP e controles, respectivamente.

Figura 3. Caracterização imunofenotípica das populações de células-tronco hematopoéticas ($CD34^+CD38^-$) e progenitores multipotentes ($CD34^+CD38^+$) a partir de suspensões de células da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas. Análise representativa dos experimentos realizados, realizada utilizando-se o *software* FlowJo v.9.6.3.

Figura 4. Caracterização imunofenotípica das populações de células-tronco hematopoéticas ($CD34^+CD38^-$) e progenitores multipotentes ($CD34^+CD38^+$) a partir de suspensões de células da medula óssea de doadores saudáveis. Análise representativa dos experimentos realizados, realizada utilizando-se o *software* FlowJo v.9.6.3.

3.2.4 Extração de RNA

As amostras previamente lisadas e congeladas com o reagente TRIZOL foram descongeladas e a cada uma foram adicionados 10 μ L de glicogênio e 200 μ L de clorofórmio. Homogeneizou-se as amostras em vortex e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa formada em cada amostra foi retirada cuidadosamente e transferida para outro tubo onde foram adicionados 500 μ L de isopropanol gelado. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos para precipitação do RNA e, após, foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o

pellet formado foi ressuspenso em etanol 70% e centrifugado à 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 15 µL de água livre de RNase. Os RNAs foram congelados em freezer a -80°C.

O RNA total obtido das amostras foi quantificado por leitura da densidade óptica (DO) no equipamento *Nanovue* (GE Healthcare Life Sciences) no comprimento de onda de 260 nm, utilizando equivalência de 40 µg/ml para 1 unidade de absorbância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280 nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 e 1,8.

3.2.5 Transcrição em cDNA

Parte do RNA extraído (1 µg) de cada amostra foi empregado na síntese do cDNA em reação de 25 µL, realizado por transcrição reversa utilizando o kit “*High Capacity cDNA Archive Kit*” (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA, por sua vez, foi diluído 5 vezes para ser utilizado nas reações de RT-PCR (*Reverse Transcriptase-polymerase chain reaction*) quantitativo.

3.2.6 PCR em tempo real para determinação da expressão dos genes da família BCL2

Os oligonucleotídeos utilizados no PCR em Tempo Real foram desenhados utilizando a ferramenta *online* IDT (do inglês, *Integrated DNA Technologies*), com base nas sequências NM_000633.2 (*hBCL2*), NM_138578.1 (*hBCL-xL*) e NM_138621.4 (*hBIM*) (Tabela 1). A expressão foi avaliada, por PCR em tempo real, nas amostras de

células mononucleares ou células CD34⁺CD38^{+/-} isoladas da medula óssea de pacientes com NMPs e controles. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando o reagente *Power Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA) no equipamento *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 62°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos). Os resultados foram avaliados através do *software Sequence Detection System V1.3* para obtenção dos valores de CT (*Threshold Cycle*). Ao final das corridas, os dados foram então exportados para planilhas do *software Excel* para cálculo dos valores de Δ CT.

Posteriormente, os resultados do PCR em tempo real (CTs) para cada transcrito foram normalizados para cada amostra, subtraindo o valor do CT obtido para o controle endógeno β ACTINA (obtendo o valor de Δ Ct). Como referência para cálculo de valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizamos as amostras controles (Pfaffl, 2001). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), utilizando testes adequados para cada tipo de análise. Os resultados foram apresentados com média +/- erro padrão. A significância estatística foi estabelecida quando $p \leq 0,05$. Foi realizada a amplificação das amostras de células mononucleares totais de 22 pacientes e 14 controles e de amostras de células progenitoras sorteadas de 14 pacientes e 8 controles. A amplificação foi realizada com cDNA na concentração de 10 ng por reação e cDNA da linhagem celular NB4 foi utilizado como amostra de referência.

Tabela 1. *Primers* e sequências usadas na determinação da expressão dos genes da família BCL2 em pacientes e controles

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<i>hBCL2</i>	NM_000633.2
<i>hBCL-xL</i>	NM_138578.1
<i>hBIM</i>	NM_138621.4

3.2.7 Pesquisa da mutação da JAK2^{V617F} e calreticulina

A identificação da mutação JAK2^{V617F} foi baseada nos resultados prévios obtidos na análise do prontuário. Foi realizada na rotina de nosso serviço para os pacientes com suspeita de NMP (PV, TE ou MFP) por meio da técnica de discriminação alélica no equipamento de Real Time 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA) com kit Jak2 MutaScreen Ipsogen (QIAGEN Inc., Valencia, CA) conforme instruções do fabricante.

Da mesma forma, a pesquisa das mutações no éxon 9 da calreticulina (*CALR*) foi obtida por genotipagem, por meio de PCR no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguida por confirmação da amplificação em gel de agarose e sequenciamento por análise de fragmentos no aparelho ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Life Technologies).

3.3 Modelo Murino

3.3.1 Obtenção do modelo murino transgênico *knockin* Jak2^{V617F}

Os primeiros animais transgênicos para a mutação Jak2^{V617F}, nos quais a expressão da mutação é controlada pelo promotor murino endógeno da Jak2, foram gentilmente cedidos pela Dra. Ann Mullally, pesquisadora do *Dana Faber Cancer Institute, Harvard Medical School*, Boston, MA, EUA. Os detalhes da geração do modelo *knockin* por meio de recombinação genética estão disponíveis na literatura (Mullally *et al.*, 2010).

Brevemente, um sítio LoxP foi introduzido anteriormente ao éxon 14 normal da JAK2 (referido como wt, a partir deste ponto) e, em seguida, um cassete de clonagem consistindo de um sítio LoxP511, o fragmento de cDNA contendo a mutação G1849T (que resulta na troca de aminoácidos V617F) numa orientação invertida em relação ao gene wt, um sítio LoxP invertido, um sítio LoxP511 invertido e o gene de resistência à neomicina flanqueado por sítios FRT. A recombinação homóloga em células embrionárias e a geração dos animais quiméricos foram realizados por métodos clássicos. A transmissão do alelo Jak2^{V617F} foi obtida por meio de cruzamento das quimeras com camundongos selvagens (wt, do inglês *wild type*) C57BL/6 e o cassete de resistência à neomicina foi removido por meio de cruzamento com animais transgênicos para a FLP1 recombinase.

Os animais Jak2^{V617F} homozigotos (JAK2 FI/FI) não são viáveis pois a construção gênica interfere com a expressão do gene Jak2 normal e funciona como *JAK2 null*, que é embrionicamente letal. Recebemos como doação os animais Jak2 wt/FI, que não tem fenótipo clínico. Após cruzamento com animais transgênicos

vavCre (obtidos como doação do Prof. Daniel G. Tenen pesquisador do *Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School*, Boston, MA, EUA), nos quais a cre-recombinase é expressa sob o controle do gene regulatório murino *vav*, especificamente em células das linhagens hematopoética e endotelial, a expressão germinativa da $Jak2^{V617F}$ é obtida. A recombinação *cre* ocorre em duas etapas, uma que remove o éxon wt e a outra que coloca a V617F em orientação normal para a transcrição (Figura 5) (Georgiades *et al.*, 2002). Os camundongos transgênicos $Jak2$ wt/FI e *vavCre* foram importados para a FMRP-USP e a colônia foi expandida através do cruzamento de animais wt/FI e *vavCre*.

Figura 5. Representação esquemática da geração do modelo transgênico *knockin* $Jak2^{V617F}$. Um sítio LoxP foi introduzido anteriormente ao éxon 14 normal da JAK2 (wt) e, em seguida, um cassete de clonagem consistindo de um sítio LoxP511, o fragmento de cDNA contendo a mutação G1849T numa orientação invertida em relação ao gene wt, um sítio LoxP511 invertido e o gene de resistência à neomicina flanqueado por sítios FRT. A transmissão do alelo $Jak2^{V617F}$ foi obtida por meio de cruzamento das quimeras com camundongos WT C57BL/6. O cassete de resistência à neomicina foi removido por meio de cruzamento com animais transgênicos para a FLP1 recombinase. Os camundongos *floxed* foram cruzados com animais transgênicos *vavCre* para a obtenção da expressão germinativa da $Jak2^{V617F}$. Adaptada de: MULLALLY, A. et al. Physiological $Jak2^{V617F}$ expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. **Cancer cell**, v. 17, n. 6, p. 584-596, 2010.

3.3.2 Genotipagem do modelo murino transgênico

Após o nascimento, foi realizada a genotipagem por PCR para correta identificação dos animais, obtendo-se e digerindo-se com soluções de NaOH 50mM e Tris-HCl 1M pH 6,8 um pequeno fragmento da orelha dos animais, após o desmame (entre 4 e 6 semanas de vida). Foram utilizados os seguintes reagentes: Taq 5U/μL (Promega GO Taq DNA Polymerase), Buffer 5X (MgCl₂ 1.5mM), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs 1.25μM cada) e os oligonucleotídeos na concentração de 10 μM. Os *primers* utilizados e os programas de temperatura de cada uma das reações estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosciences, Foster City, CA, EUA). A análise genotípica *Jak2* e *vav-Cre* foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose à 2,5%.

Tabela 2. *Primers* e sequências usadas para genotipagem dos animais transgênicos.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
Jak2.1	CGTGCATAGTGTCTGTGGAAGTC
Jak2.2	CGTGGAGAGTCTGTAAGGCTCAA
vav-Cre.F	AGATGCCAGGACATCAGGAACCTG
vav-Cre.R	ATCAGCCACACCAGACACAGAGATC

Tabela 3. Programa utilizado para as reações de genotipagem por PCR.

Gene	35 ciclos					Resfriamento
	Desnaturação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	
<i>Jak2</i>	95° 3'	95° 30''	64° 60''	72° 60''	72° 2'	4-10°C ∞
<i>vav-Cre</i>	95° 3'	95° 30''	60° 60''	72° 60''	72° 2'	4-10°C ∞

Para expansão da colônia e obtenção de animais para experimentação, foram realizados acasalamentos entre animais *Jak2* wt/FI *vavCre*⁻ e animais *Jak2* wt/wt *vavCre*⁺. Animais *Jak2* wt/wt *vavCre*⁻ foram sacrificados. Os animais *Jak2* wt/FI *vavCre*⁺, com fenótipo de Policitemia Vera (PV) e os animais *Jak2* wt/wt *vavCre*⁺, controles, foram utilizados para experimentação. A escolha do genótipo utilizado como controle foi baseada na expressão de *Jak2* wt e concluímos que camundongos wt/wt *vavCre*⁺ possuem níveis de expressão de *Jak2* comparáveis com camundongos wt/FI *vavCre*⁺ (ou wt/VF), como representado nas Figuras 6 e 7.

Os animais utilizados nesta pesquisa foram mantidos no biotério do Centro de Terapia Celular da FMRP-USP, sob condições livre de patógenos (*SPF*, do inglês *specific pathogen free*) e de acordo com as políticas do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais. Os experimentos envolvendo manipulação dos animais transgênicos foram realizados no Laboratório de Estudos Experimentais em Animais da Instituição, localizado no mesmo prédio do biotério.

Figura 6. Ilustração da genotipagem para a presença do alelo *Jak2* mutado e *vav-Cre* no modelo murino *Jak2*^{V617F}. Os PCRs para a detecção de parte da sequência da *Jak2* contendo a mutação V617F e da *vav-Cre* recombinase foram realizados usando como molde DNA genômico obtido de fragmentos da cauda dos animais transgênicos (gel de agarose à esquerda). A comprovação da excisão na linhagem hematopoética foi realizada a partir de DNA obtido do sangue (gel de agarose à direita). +/+ : *Jak2* wt/wt; +/FI : *Jak2* wt/FI (alelo *floxed* ou flanqueado pelos sítios loxP – animal portador da mutação V617F silenciada); +/VF : *Jak2* wt/V617F (animal portador da mutação e da cre-recombinase que coloca a mutação V617F na posição de transcrição, levando à sua expressão). Neste exemplo, o animal 76 é *Jak2* wt/wt *vavCre*⁻; o animal 74 é *Jak2* wt/wt *vavCre*⁺; o animal 66 é *Jak2* wt/FI *vavCre*⁻; e os animais 73 e 75 são *Jak2* wt/FI *vavCre*⁺, portanto *Jak2* wt/VF. No gel à direita, confirma-se a expressão da *Jak2*^{V617F} apenas no tecido hematopoético (sangue).

Figura 7. Ilustração da expressão *Jak2* wt e da *Jak2* V617F por meio de PCR em Tempo Real nos vários genótipos possíveis da colônia *Jak2*/*vav-Cre*. A expressão relativa da *Jak2* em amostras de medula óssea dos animais transgênicos gerados na colônia, em relação ao gene constitutivo *Gapdh* é demonstrada.

3.3.3 Caracterização das subpopulações de progenitores hematopoéticos dos animais Jak2 wt/VF

Os animais Jak2 wt/Fl vavCre⁺ foram identificados como Jak2 wt/VF ou +/VF por razões didáticas.

A caracterização das subpopulações de células-tronco e progenitores hematopoéticos foi realizada por meio de citometria de fluxo utilizando as descrições clássicas das subpopulações LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ ckit^{hi}) contendo as células-tronco hematopoéticas mais imaturas e os progenitores mieloides (MP, Lin⁻ Sca-1⁻ ckit^{hi}). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACS ARIA (BD Biosciences) e a análise realizada utilizando o *software* FlowJo v.9.6.3.

3.3.4 Isolamento das subpopulações de progenitores murinos hematopoéticos Jak2^{V617F} e controles

As subpopulações celulares murinas LSKs (Lin⁻, Sca1⁺ e cKit^{hi}) e progenitores mieloides (MPs, Lin⁻, Sca1⁻, cKit^{hi}) foram isoladas por meio de *sorting*. Descrevendo sumariamente o método de separação, a suspensão de células da medula óssea foi obtida por meio de esmagamento dos ossos da medula óssea (fêmures, tíbias, quadril e coluna vertebral). Após lise do componente eritroide, a suspensão de células foi depletada das células maduras por meio de marcação com anticorpos biotinilados definidores de linhagem Ter119 (clone TER-119, Biolegend), CD19 (clone 6D5, Biolegend), B220 (clone RA3-6B2, Biolegend), CD8a (clone 53-6.7, Biolegend), Gr1 (clone RB6-8C5, Biolegend) e CD11b (clone ICRF44, Biolegend) seguida da marcação com *beads* estreptavidina e depleção no sistema auto-MACS

(Miltenyi Biotec). A suspensão linhagem negativa foi marcada com anticorpos fluorescentes estreptavidina-PerCP (Biolegend), ckit-APC-Cy7 (clone 2B8, Biolegend), Sca-1-APC (clone E13-161.7, Biolegend), permitindo a identificação das populações LSK e MP e separação destas por meio do *sorting* em tampão PBS 1X. A análise foi realizada utilizando o *software* FlowJo v.9.6.3.

3.3.5 Cultura de células progenitoras hematopoéticas murinas Jak2^{V617F} e controles

Os progenitores hematopoéticos dos animais transgênicos Jak2^{V617F}, isolados por meio de sorting, foram cultivados a 37°C e 5% de CO₂, em placas de 96 *wells*, na presença de citocinas (*stem cell fator* – SCF 50 ng/mL, FLT3 10 ng/mL, IL3 10 ng/mL, IL6 10 ng/mL) em meio de cultura StemSpan™ H3000 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) e tratadas com inibidor da JAK 1/2, Ruxolitinibe 300 nM (INCB018424, Selleck Chemicals, USA) e/ou inibidor de BCL2, Obatoclax 250 nM (GX15-070, Selleck Chemicals, USA). As doses e o tempo de tratamento utilizados foram baseados no estudo pré-clínico do Ruxolitinibe (Quintás-Cardama *et al.*, 2010; Verstovsek *et al.*, 2010; Verstovsek *et al.*, 2012) e dos estudos com droga BH3-*símile* (Trudel *et al.*, 2007; Goard e Schimmer, 2013). Após 24 horas de cultura, as células foram recuperadas da placa e lavadas em tampão PBS 1X e utilizadas para os ensaios descritos a seguir.

3.3.6 Extração de RNA

Após obtenção das amostras de células da medula óssea total e das subpopulações de células progenitoras (LSKs e MPs), em estado basal ou após

tratamento com drogas inibidoras da JAK2 e BCL2, estas foram ressuspensas em 250 µL de PBS 1X com DEPC e 750 µL de TRIZOL e mantidas em freezer a -80°C para posterior extração de RNA.

As amostras armazenadas em Trizol foram descongeladas e a cada uma foi adicionado 10 µL de glicogênio e 200 µL de clorofórmio. Homogeneizou-se as amostras em vortex e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa formada em cada amostra foi retirada cuidadosamente e transferida a outros tubos, nos quais foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado. Foram mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos para precipitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* formado foi ressuspenso em etanol 70% e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 15 µL de água livre de RNase. Os RNAs foram congelados a -80°C.

O RNA total obtido das amostras foi quantificado por leitura da densidade optica (DO) em *Nanovue* no comprimento de onda de 260 nm, utilizando equivalência de 40 µg/ml para 1 unidade de absorbância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280 nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 e 1,8.

3.3.7 Transcrição em cDNA

Parte do RNA extraído (1µg) de cada amostra foi empregado na síntese do cDNA (25 µL), realizado por transcrição reversa utilizando o kit “*High Capacity cDNA Archive Kit*”, seguindo as instruções do fabricante. O cDNA por sua vez foi diluído 5 vezes para ser utilizado nas reações de PCR.

3.3.8 PCR em Tempo Real para determinação da expressão dos genes da família BCL2

Os oligonucleotídeos utilizados no PCR em Tempo Real (RT-PCR) foram desenhados utilizando a ferramenta *online* IDT (do inglês, *Integrated DNA Technologies*), com base nas sequências NM_009741.3 (*mBcl2*), NM_009743.4 (*mBcl-xl*) e NM_207680.2 (*mBim*) (Tabela 4). A expressão foi avaliada por RT-PCR das amostras de camundongos e foram realizadas em duplicata utilizando primers em conjunto com o reagente Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) no equipamento 7300 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 62°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos). Os resultados foram avaliados através do *software Sequence Detection System V1.3* para obtenção dos valores de *Threshold Cycle* (CT), no final das corridas os dados foram então exportados para planilhas do *software* Excel para cálculo dos valores de ΔCT .

Posteriormente, os resultados do PCR em tempo real (CTs) para cada transcrito foram normalizados para cada amostra, subtraindo o valor do CT obtido para o controle endógeno GAPDH (obtendo o valor de ΔCt). Como referência para cálculo de valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizamos as amostras controles (Pfaffl, 2001).

As análises estatísticas foram realizadas através do *software GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA*), utilizando testes adequados a cada tipo de análise. Os resultados foram apresentados com média $\pm$ erro padrão. A significância estatística foi estabelecida quando $p \leq 0,05$.

Tabela 4. Primers e sequências usadas na determinação da expressão dos genes da família BCL2 nos animais transgênicos.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<i>mBcl2</i>	NM_009741.3
<i>mBcl-xl</i>	NM_009743.4
<i>mBim</i>	NM_207680.2

3.3.9 Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)

As doses de obatoclax e ruxolitinibe utilizadas nos experimentos foram baseadas em revisão de literatura considerando ensaios pré-clínicos já padronizados (Trudel *et al.*, 2007; Quintás-Cardama *et al.*, 2010; Verstovsek *et al.*, 2010; Verstovsek *et al.*, 2012; Goard e Schimmer, 2013). A viabilidade celular após o tratamento *in vitro* com o uso de doses sucessivas foi avaliada por meio do ensaio de MTT. Para o ensaio, uma suspensão de células da medula óssea de 3 camundongos Jak2 wt/VF (PV) e 3 camundongos Jak2 wt/wt (controles) foram obtidas por esmagamento dos ossos e após lise do componente eritroide, 1×10^6 de células mononucleares foram cultivadas a 37°C e CO₂ 5%, em placas de 96 wells, na presença de citocinas (*stem cell factor* – SCF 50 ng/mL, FLT3 10 ng/mL, IL3 10 ng/mL, IL6 10 ng/mL) em meio de cultura RPMI1640 suplementado com 10% de SBF e tratadas com ruxolitinibe 300nM e/ou obatoclax 250nM ou DMSO. Após 24 horas, foram adicionados 10 µL de MTT a 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e a placa foi incubada por 4 horas. Após este período, a placa foi centrifugada a 2000rpm por 5 minutos e escaneada para análise por densitometria com o *software* UN-SCAN-IT. A seguir, 80 µL de isopropanol ácido foi adicionado por poço e a placa mantida a temperatura ambiente por 15 minutos até que os cristais formados fossem dissolvidos. A viabilidade celular foi

avaliada por absorbância a 570 nm através de leitor automático de placas. Os dados foram então exportados para o *software* Excel e a análise estatística foi realizada por ANOVA e pós-teste de Bonferroni. A Figura 8 ilustra os dados do experimento realizado para padronização das doses utilizadas no estudo e estabelecimento das curvas dose-efeito dos inibidores utilizados.

Figura 8. Viabilidade celular após o tratamento *in vitro* com diferentes concentrações do inibidor de BCL2, obatoclax, (Ø : veículo, 25, 100, 250, 500 e 1000nM) e do inibidor de Jak1/2, ruxolitinibe, (Ø : veículo, 30, 100, 300, 600 e 1000nM) de células da medula óssea de animais Jak2 wt/VF avaliado pelo ensaio de MTT. A análise foi realizada por ANOVA e pós-teste de Bonferroni utilizando o *software* GraphPad Prism 5, com valores de *p* definidos como: **p*<0.05, ***p*<0.01 e ****p*<0.001.

O IC50 (do inglês, *median Inhibition Concentration*) para avaliação da eficiência das drogas utilizadas foi avaliado por meio de análise de regressão não linear com *software* Calcsyn (Biosoft). O obatoclax foi testado nas doses de 0, 25, 100, 250, 500 e 1000 nM enquanto para o ruxolitinibe foram utilizadas as seguintes concentrações: 0, 30, 100, 300, 600 e 1000 nM (Figura 9).

Figura 9. Curva dose-efeito das drogas obatoclax e ruxolitinibe sobre a viabilidade de células da medula óssea de animais portadores da mutação $Jak2^{V617F}$. As células mononucleares de animais $Jak2$ wt/VF foram tratadas *in vitro* com inibidor de BCL2 (obatoclax, em A) ou inibidor de $Jak1/2$ (ruxolitinibe, em B) com diferentes concentrações (veículo, 25, 100, 250, 500 e 1000 nM; veículo, 30, 100, 300, 600 e 1000 nM, respectivamente) para realização da curva dose-efeito avaliada pelo ensaio de methylthiazoletetrazolium (MTT). Análise por meio do *software* Calcsyn (Biosoft).

3.3.10 Avaliação de apoptose

Com o intuito de avaliar se a inibição da família BCL2 (com o inibidor de BCL2 obatoclax) por meio do tratamento de células precursoras hematopoéticas em combinação à inibição da JAK2 (com ruxolitinibe), tem atividade sinérgica sobre a indução de apoptose, utilizamos amostras de medula óssea de 3 camundongos Jak2 wt/VF (PV) e 3 camundongos Jak2 wt/wt (controles) obtidas por técnica já descrita previamente. As suspensões celulares (1×10^6 de células de cada animal) foram cultivadas a 37°C e CO₂ 5%, em placas de 48 *wells*, na presença de citocinas (*stem cell factor* – SCF 50 ng/mL, FLT3 10 ng/mL, IL3 10 ng/mL, IL6 10 ng/mL) em meio de cultura Stemspan H300 e tratadas com ruxolitinibe 300 nM e/ou obatoclax 250 nM ou veículo (DMSO). Após 24 horas, as células foram recuperadas e foi realizada a depleção das células maduras por meio de marcação com anticorpos biotinilados definidores de linhagem Ter119 (clone TER-119, Biolegend), CD19 (clone 6D5, Biolegend), B220 (clone RA3-6B2, Biolegend), CD8a (clone 53-6.7, Biolegend), Gr1 (clone RB6-8C5, Biolegend) e CD11b (clone ICRF44, Biolegend) seguida da marcação com anticorpos fluorescentes estreptavidina-PerCP (Biolegend), ckit-APC-Cy7 (clone 2B8, Biolegend), Sca-1-APC (clone E13-161.7, Biolegend), permitindo a identificação das populações de interesse, LSKs e MPs. As células foram então marcadas com anexina V-FITC (Biolegend) e 7-AAD (Biolegend) para análise da viabilidade celular por meio de citometria de fluxo.

A viabilidade celular foi analisada levando-se em consideração o fato da anexina V e do 7-AAD serem marcadores de apoptose/necrose celular. A anexina V é uma proteína ligadora de fosfolípídeo dependente de cálcio que possui alta

afinidade pelo fosfolípídeo fosfatidilserina (PS), exposta na bicamada lipídica da membrana celular de células em fase inicial de apoptose. O 7-AAD é um composto químico que apresenta fluorescência e que se intercala entre as bases de DNA de dupla fita desde que a membrana celular esteja permeável (Vermes I, 2000). Dessa forma, o uso de anexina V e 7-AAD é capaz de identificar: células positivas à coloração pela anexina V e negativas pelo 7-AAD, definidores de células em apoptose inicial; células com incorporação simultânea de anexina V e 7-AAD, definidoras de apoptose tardia. Necrose foi definida como células 7-AAD positivas. A aquisição dos dados foi realizada por meio do equipamento FACS ARIA (BD Biosciences) e a análise fenotípica com o *software* FlowJo v.9.6.3 (Figura 10). A análise estatística foi realizada por ANOVA.

Jak 2 wt/wt

Jak 2 wt/VF

Figura 10. Estratégia de *gates* utilizada para análise de apoptose com a marcação com anexina V e 7-AAD. As células mononucleares da medula óssea de camundongos Jak2 wt/wt (controle) e Jak2 wt/VF (policitemia vera) foram cultivadas por 24 horas na presença de veículo, ruxolitinibe 300 nM e/ou obatoclax 250 nM e realizada marcação com anticorpos definidores de linhagem para obtenção das subpopulações de células precursoras imaturas (LSK) e mais maduras (MP) por citometria de fluxo. Análise realizada com o *software* FlowJo v.9.6.3.

3.3.11 Ensaio de formação de colônia

O ensaio de formação de colônia foi realizado em meio semi-sólido de metilcelulose (MethoCult GF3434, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canadá) com o intuito de avaliar se a inibição da família BCL2 (com o inibidor de BCL2 obatoclax) por meio do tratamento *in vitro* de células precursoras hematopoéticas murinas em combinação à inibição da Jak2 (com ruxolitinibe), tem atividade sinérgica sobre o potencial clonogênico. Para tal, 1×10^5 células totais de medula óssea/mL de 3 camundongos Jak2 wt/VF (PV) e 3 camundongos Jak2 wt/wt (controles), obtidas por técnica já descrita previamente, foram semeadas em 500 μ L de metilcelulose em placa de 12 *wells* e tratadas com ruxolitinibe 300 nM e/ou obatoclax 250 nM ou veículo (DMSO). As colônias foram contadas em microscópio invertido após 10 dias de cultivo e classificadas de acordo com sua morfologia em CFU-GM (Unidade formadora de colônias de granulócitos/monócitos), CFU-G (Unidade formadora de colônias de granulócitos), CFU-M (Unidade formadora de colônias de monócitos), BFU-E (Unidade formadora de colônias eritroides) e CFU-GEMM (Unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos). A análise estatística foi realizada por ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com NMP incluídos no estudo

Conforme descrito anteriormente, foram coletadas amostras de medula óssea total de 31 pacientes entre 18 e 86 anos com indicação de realização de punção aspirativa de medula óssea para investigação diagnóstica inicial de NMP ou para avaliação da doença, em caso de diagnóstico prévio já confirmado de NMP, independente da presença da mutação $JAK2^{V617F}$, e na ausência de tratamento citorredutor. Nove pacientes foram inicialmente excluídos por não confirmação do diagnóstico de NMP, restando 22 amostras de pacientes com NMP confirmada. Dentre os 22 pacientes, 5 (22%) tinham diagnóstico de PV (2 pacientes de baixo e 3 de alto risco), 8 (36%) de TE (1 paciente muito baixo, 1 paciente baixo e 6 pacientes de alto risco) e 9 (42%) de MFP (1 paciente de baixo risco, 3 pacientes de risco intermediário-1, 2 pacientes de risco intermediário-2 e 3 pacientes de alto risco, de acordo com o IPSS (*International Prognostic Scoring System*)). A mediana de idade do grupo estudado foi de 61 anos (30-86 anos). Doze (54%) pacientes eram do sexo masculino enquanto 10 (46%), feminino. A presença da mutação $JAK2^{V617F}$ foi observada em 3/5 pacientes com diagnóstico de PV, 4/8 pacientes com TE, e 4/9 pacientes com MFP. A mutação da calreticulina foi detectada em 2 pacientes com TE e MFP negativos para a mutação $JAK2^{V617F}$. Amostra de 1 paciente com MFP não foi analisada para pesquisa de mutação no gene *calreticulina* (*CALR*) pois o material era insuficiente. Em relação às complicações mais frequentemente observadas, 6 (27%) de todos os pacientes apresentaram trombose (venosa ou arterial) em algum

momento da evolução. Os parâmetros hematimétricos analisados ao diagnóstico com suas medianas e intervalos foram: hemoglobina (g/dL), 13,6 (8,0-20,8); hematócrito (%), 40 (25-64,4); leucócitos ($\times 10^9/L$), 10,85 (0,7-64,7) e plaquetas ($\times 10^9/L$), 804 (22-1659). Quatorze amostras de doadores saudáveis de MO foram utilizadas como controle.

Amostras de 13 pacientes (1 amostra excluída por ausência de amplificação) e 8 controles foram obtidas para isolamento das subpopulações de células CD34⁺CD38⁻ e CD34⁺CD38⁺: 2 tinham o diagnóstico de PV (2 pacientes de baixo risco), 6 de TE (1 paciente de muito baixo risco, 1 paciente de baixo risco e 4 pacientes de alto risco) e 5 de MFP (1 paciente de baixo risco, 1 paciente de risco intermediário-2 e 3 pacientes de alto risco, de acordo com o IPSS). A mediana de idade do grupo estudado foi de 57 anos (30-86 anos). Sete (54%) pacientes eram do sexo masculino enquanto 6 (46%) eram do sexo feminino. A presença da mutação JAK2^{V617F} foi observada em 7 destes pacientes, 4 deles portadores de TE e 3 com diagnóstico de MFP. A mutação da *calreticulina* foi detectada em 1 paciente negativo para a mutação JAK2^{V617F} portador de TE e em 1 portador de MFP. Os parâmetros hematimétricos analisados ao diagnóstico com suas medianas e intervalos foram: hemoglobina (g/dL), 13 (8,0-20,8); hematócrito (%), 40 (25-64); leucócitos ($\times 10^6/L$), 10 (0,7-62,8) e plaquetas ($\times 10^6/L$), 875 (22-1572). Os dados distribuídos por grupo de doença podem ser melhor analisados nas Tabelas 5 e 6.

No mesmo período, foi realizada uma revisão histórica por meio da análise dos prontuários dos pacientes em investigação ou seguimento devido o diagnóstico de NMP, atendidos no HCFMRP-USP no período de 2007 a Julho de 2016. No total, 184 pacientes realizaram acompanhamento no ambulatório de Hematologia. Quarenta e sete (25%) pacientes apresentavam o diagnóstico de PV, 59 (32%) de TE, 78 (43%)

de MFP. Os pacientes com NMP não classificável ou diagnóstico não confirmado foram excluídos da análise. A mediana de idade do grupo estudado foi de 64 anos (16-103 anos). Noventa e um (49%) pacientes eram do sexo masculino enquanto 93 (51%) do sexo feminino. A presença da mutação *JAK2*^{V617F} foi observada em 103 (56%) pacientes. Em relação às complicações mais frequentemente observadas, 40 (21%) pacientes apresentaram trombose (venosa ou arterial) em algum momento da evolução. Os parâmetros hematimétricos analisados ao diagnóstico com suas medianas e intervalos foram: hemoglobina (g/dL), 13,9 (4,5- 23,7); hematócrito (%), 42 (14-73); leucócitos ($\times 10^9/L$), 11.1 (0,7-129) e plaquetas ($\times 10^9/L$), 627,5 (14-2230). Os dados distribuídos por grupo de doença podem ser melhor visualizados na Tabela 7. Atualmente, 137 pacientes permanecem em seguimento ambulatorial, 59 (43%) com diagnóstico de PV, 40 (29%) de TE e 38 (28%) de MFP.

Tabela 5. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas incluídos no estudo (2014-2016).				
	Total	Policitemia vera	Trombocitemia essencial	Mielofibrose primária
Pacientes estudados	22	5	8	9
Sexo (masculino/feminino)	12/10	4/1	4/4	4/5
Idade em anos, mediana (variação)	61(30-86)	58(46-82)	61(30-86)	64(43-78)
Risco*		2/3	1/1/0/6	1/3/2/3
Visceromegalia (sim/não)**	5/17	1/4	0/8	4/5
Eventos tromboembólicos (sim/não)***	7/15	2/3	2/6	3/6
Sangramento (sim/não)	0/22	0/5	0/8	0/9
Necessidade transfusional (sim/não)	3/19	0/5	0/8	3/6
Mutação <i>JAK2</i> ^{V617F} (positiva/negativa)	11/11	3/2	4/4	4/5
Mutação <i>Calreticulina</i> (positiva/negativa)	4/4	NA	2/2	2/2****
Parâmetros hematimétricos ao diagnóstico, mediana (variação)				
Hemoglobina (g/dL)	13,6(8,0-20,8)	19,6(12,7-20,8)	12,9(11,4-15,4)	13,7(8,0-16,2)
Hematócrito (%)	40(25-64,4)	60(40-64,4)	39,5(35-46)	41(25-47)
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	10,85(0,7-64,7)	8,5(6,2-13,6)	10,7(3,3-13,9)	12,7(0,7-64,7)
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	804(22-1659)	210(184-702)	1169(848-1572)	788(22-1659)

* Classificação de risco: policitemia vera: baixo/alto risco; trombocitemia essencial: muito baixo/baixo/intermediário/alto risco; mielofibrose primária: baixo/intermediário-1/intermediário-2/alto risco (IPSS, *International Prognostic Scoring System*).

** Hepatomegalia ou esplenomegalia detectadas ao exame físico ou por ultrassonografia de abdômen.

*** Eventos isquêmicos, trombóticos ou embólicos, sem outra causa associada aparente.

**** Um paciente excluído por insuficiência de amostra.

Tabela 6. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas incluídos no estudo das subpopulações de células (2014-2016).				
	Total	Policitemia vera	Trombocitemia essencial	Mielofibrose primária
Pacientes estudados	13	2	6	5
Sexo (masculino/feminino)	7/6	2/0	3/3	2/3
Idade em anos, mediana (variação)	57(30-86)	51(46-56)	56,6(30-86)	67(51-78)
Risco*		2/0	1/1/0/4	1/0/1/3
Visceromegalia (sim/não)**	3/10	0/2	0/6	3/2
Eventos tromboembólicos (sim/não)***	4/9	0/2	2/4	2/3
Sangramento (sim/não)	0/13	0/2	0/6	0/5
Necessidade transfusional (sim/não)	3/10	0/2	0/6	3/2
Mutação <i>JAK2</i> ^{V617F} (positiva/negativa)	7/6	0/2	4/2	3/2
Mutação <i>Calreticulina</i> (positiva/negativa)	2/2	NA	1/1	1/1
Parâmetros hematimétricos ao diagnóstico, mediana (variação)				
Hemoglobina (g/dL)	13(8,0-20,8)	20,65(20,5-20,8)	12,9(11,4-15,4)	12,5(8,0-14,2)
Hematócrito (%)	40(25-64)	62(60-64)	39,5(35-46)	37(25-43,9)
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	10(0,7-62,8)	7,35(6,2-8,5)	10,7(7,2-13,5)	12,7(0,7-62,8)
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	875(22-1572)	194(184-204)	1206(1120-1572)	795(22-875)

* Classificação de risco: policitemia vera: baixo/alto risco; trombocitemia essencial: muito baixo/baixo/intermediário/alto risco; mielofibrose primária: baixo/intermediário-1/intermediário-2/alto risco (IPSS, *International Prognostic Scoring System*).

** Hepatomegalia ou esplenomegalia detectadas ao exame físico ou por ultrassonografia de abdômen.

*** Eventos isquêmicos, trombóticos ou embólicos, sem outra causa associada aparente.

Tabela 7. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP, 2007-2016).

	Total	Policitemia vera	Trombocitemia essencial	Mielofibrose primária
Pacientes estudados	184	47	59	78
Sexo (masculino/feminino)	91/93	19/28	25/34	47/31
Idade em anos, mediana (variação)	64(16-103)	58(25-85)	58(16-86)	66,5(34-103)
Visceromegalia (sim/não)*	64/120	15/32	6/53	43/35
Eventos tromboembólicos (sim/não)**	40/144	17/30	10/49	13/65
Sangramento (sim/não)	9/175	2/45	3/56	4/74
Necessidade transfusional (sim/não)	29/155	0/47	2/57	27/51
Mutação <i>JAK2</i> ^{V617F} (positiva/negativa)	103/81	37/10	28/31	38/40
Parâmetros hematimétricos ao diagnóstico, mediana (variação)				
Hemoglobina (g/dL)	13,9(4,5-23,7)	17,9(8,5-23,7)	13,8(9,9-16,9)	11,6(4,5-21,4)
Hematócrito (%)	42(14-73)	55(26-73)	41(27-49)	36(14-64)
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	11,1(0,7-129)	10(4,3-41,7)	9,8(3,3-21,4)	14,1(0,7-129,2)
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	627,5(14-2230)	347(157-1280)	1001(314-2230)	537(14-1659)

* Hepatomegalia ou esplenomegalia detectadas ao exame físico ou por ultrassonografia de abdômen.

** Eventos isquêmicos, trombóticos ou embólicos, sem outra causa associada aparente.

4.2 Caracterização fenotípica dos animais transgênicos Jak2^{V617F} e controles

Como este trabalho foi o primeiro a utilizar o modelo murino Jak2^{V617F} no laboratório de Hematologia Experimental da FMRP-USP, decidimos caracterizar o fenótipo dos animais gerados durante o estudo para demonstrar a eficiência da nossa ferramenta de estudo. Ademais, o artigo original de geração do modelo obteve a expressão condicional da mutação V617F com Cre-recombinase (E2A-Cre) diferente da usada em nosso laboratório, vavCre, que determina a expressão no tecido hematopoético e células endoteliais. Embora esperássemos obter o mesmo fenótipo, caracterizamos a NMP no modelo Jak2V617F/vav-Cre gerado em nosso biotério. Foram analisadas as características fenotípicas de 61 camundongos transgênicos, sendo 26 Jak2 wt/VF (PV) e 35 Jak2 wt/wt (controles). Todos foram sacrificados entre 10-12 semanas de vida. Observamos na nossa colônia comportamento semelhante ao já descrito na literatura, ou seja, os animais Jak2 wt/VF desenvolveram uma NPM letal com 100% de penetrância a partir de quatro semanas de vida, com sobrevida média de 80-150 dias. Os animais portadores da mutação apresentaram elevação do hematócrito (Ht), leucocitose, esplenomegalia e hematopoese extramedular proeminente, muito semelhante à PV humana.

Em relação aos animais PV, 11 (42%) eram machos e 15 (58%) eram fêmeas. No grupo controle, 18 (51%) eram machos e 17 (49%) eram fêmeas. Os parâmetros hematimétricos para os animais com PV analisados no dia do sacrifício com suas medianas e intervalos foram: hemoglobina (g/dL), 24 (17,5- 26); hematócrito (%), 72,9 (53,4-91); leucócitos ($\times 10^9/L$), 12,6 (2,0-30,2) e plaquetas ($\times 10^9/L$), 2382 (1230-4532). No grupo controle: hemoglobina (g/dL), 13,5 (10,9-15,4); hematócrito (%), 44,4 (34-54); leucócitos ($\times 10^9/L$), 4,8 (1,3-16,7) e plaquetas ($\times 10^9/L$), 360 (114-1268). O

tamanho do baço (gramas) nos animais com PV apresentou mediana de 0,38 (0,18-0,52) gramas enquanto nos controles, a mediana foi de 0,08 (0,01- 0,19) gramas. Os dados dos animais Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt podem ser melhor observados na Tabela 6 e Figuras 11 e 12.

Tabela 6. Características clínicas e laboratoriais do modelo murino Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt.

	Policitemia vera	Controle
Camundongos	26	35
<i>Jak2</i> ^{V617F}	wt/FI	wt/wt
<i>Vav-Cre</i>	positivo	positivo
Sexo (Masculino/Feminino)	11/15	18/17
Parâmetros hematimétricos, mediana (variação)		
Hemoglobina (g/dL)	24(17,5-26)	13,5(10,9-15,4)
Hematócrito (%)	72,9(53,4-91)	44,6(34-54)
Leucócitos (x 10 ⁹ /L)	12,6(2,0-30,2)	4,8(1,3-16,7)
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	2382(1230-4532)	360(114-1268)
Peso baço (g)	0,38(0,18-0,52)	0,08(0,01-0,19)

Figura 11. Imagem representativa do tamanho do baço de animais Jak2^{V617F} (wt/VF) em comparação aos controles (wt/wt).

Figura 12. Características fenotípicas de animais transgênicos Jak2 wt/VF (policitemia vera) e Jak2 wt/wt (controle) em relação à Hemoglobina (Hb, g/dL), Hematocrito (Ht, %), Glóbulos brancos (Gb, 1000/ μ L), Plaquetas (1000/ μ L) e peso do baço (gramas). Análise realizada por Teste de Mann-Whitney com valores significativos quando $p < 0.05$.

Vale ressaltar que, segundo a descrição prévia do modelo semelhante gerado com a recombinação por meio de E2ACre, a letalidade desses animais está relacionada a eventos trombóticos que ocorrem até 4 a 6 meses de vida. Mielofibrose e transformação leucêmica não são observados nesse modelo devido à letalidade precoce, mas receptores congênicos letalmente irradiados e transplantados com CTH obtidas dos animais Jak2 wt/VF desenvolvem fibrose medular (Mullally *et al.*, 2010).

A caracterização imunofenotípica das subpopulações de progenitores hematopoéticos dos animais Jak2 wt/VF e controles está demonstrada na Figura 13

(Akashi *et al.*, 2000; Yilmaz *et al.*, 2006; Pronk *et al.*, 2007; Pronk e Bryder, 2011). Embora este não seja um dos objetivos do presente trabalho, como parte da caracterização de nosso modelo murino, observamos que, aparentemente, os animais Jak2 wt/VF apresentam expansão do compartimento de LT-HSC (do inglês, *long-term hematopoietic stem cell*), reconhecido por iniciar a NMP, e MEP, que expandem e dão origem a maioria das anormalidades fenotípicas da PV murina.

Figura 13. Análise representativa da caracterização imunofenotípica das populações de células-tronco hematopoéticas e progenitores multipotentes da medula óssea de animais Jak2 wt/wt (+/+, controles) e Jak2 wt/VF (+/VF, policitemia vera). Para análise, as células viáveis (DAPI negativas) e linhagem negativas (Ter-119, CD19, B220, CD8, Gr1, CD11b negativas), foram selecionadas quanto à expressão de cKit e Sca-1 que definem as populações LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ cKit^{hi}) e MP (mieloprogenitores, Lin⁻ Sca-1⁻ cKit^{hi}). Dentre a população de MPs, as populações de progenitores CMP (do inglês, *common myeloid progenitor*, Lin⁻ Sca-1⁻ cKit^{hi} CD34⁺ FcgRII/III^{lo}), GMP (do inglês, *granulocyte-macrophage progenitor*, Lin⁻ Sca-1⁻ cKit^{hi} CD34⁺ FcgRII/III^{hi}) e MEP (do inglês, *myeloerythroid progenitor*, Lin⁻ Sca-1⁻ cKit^{hi} CD34⁻ FcgRII/III⁻) foram definidas. Da mesma forma, a população de células LSK foi estudada quanto à expressão de CD34 e Flt3, permitindo diferenciá-las em LT-HSC (do inglês, *long-term hematopoietic stem cell*), ST-HSC (do inglês, *short-term hematopoietic stem cell*) e MPP (do inglês, *multipotent progenitors*). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACS ARIA (BD Biosciences) e a análise realizada utilizando o software FlowJo v.9.6.3.

4.3 Expressão gênica

4.3.1 Expressão gênica diferencial dos genes *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* em células progenitoras hematopoéticas (CD34⁺), células precursoras hematopoéticas imaturas (CD34⁺CD38⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34⁺CD38⁺) de pacientes portadores de NMP e controles

Foram analisadas amostras de CPH CD34⁺ de medula óssea de 22 pacientes e 14 controles (doadores de medula óssea saudáveis). A análise da expressão gênica por RT-PCR em células CD34⁺ de todos os pacientes com NMPs incluídas no estudo, independentemente do subtipo de NMP ou da presença da mutação da JAK2^{V617F}, mostrou que não houve diferença estatística na expressão dos genes antiapoptóticos *BCL-xL* e *BCL2* e do gene pró-apoptótico *BIM* (mediana: 3.91, 0.06 e 0.54, respectivamente) em relação aos controles (mediana: 3.47, 0,07 e 0.41, respectivamente), com $p > 0.05$ (Figura 14A-C).

Figura 14. Expressão gênica em células CD34⁺ da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (PV, Policitemia Vera; TE, Trombocitemia essencial e MFP, Mielofibrose primária) associadas à mutação JAK2^{V617F} em relação aos controles normais. Não houve diferença na expressão dos genes antiapoptóticos *BCL-xL* e *BCL2* e do gene pró-apoptótico *BIM* nas células CD34⁺ da medula óssea total de pacientes comparados aos controles em **A**, **B** e **C**, respectivamente ($p > 0.05$). As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta C_t}$) e foram realizadas pelo Teste de Mann-Whitney.

Quando as doenças foram categorizadas em seus subtipos, observamos que não houve diferença de expressão do gene antiapoptótico *BCL-xL* bem como do pró-apoptótico *BIM* nas células $CD34^+$ de pacientes portadores de PV, TE e MFP quando comparadas às células $CD34^+$ dos controles como demonstrado nas Figura 15A e 15C. Em células $CD34^+$ de pacientes com diagnóstico de TE, a expressão do gene antiapoptótico *BCL2* foi maior em relação às células $CD34^+$ dos pacientes com MFP ($p=0.03$ por ANOVA e pós-teste de Turkey $p=0.02$) e com tendência a maior expressão em relação aos controles ($p=0.12$), como evidenciado na Figura 15B.

Figura 15. Expressão dos genes *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* por PCR em Tempo Real em células $CD34^+$ da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (PV, Policitemia Vera; TE, Trombocitemia essencial e MFP, Mielofibrose primária) em relação aos controles normais (CT). **A.** Não houve diferença significativa na expressão do gene antiapoptótico *BCL-xL* na PV (n=5), TE (n=6) e MFP (n=9) em relação aos controles (n=13) ($p=0.28$); **B.** A expressão do gene antiapoptótico *BCL2* foi maior em pacientes com TE em relação aos pacientes com MFP ($p=0.03$, ANOVA; $p=0.02$, pós-teste); **C.** Não houve diferença significativa na expressão do gene pró-apoptótico *BIM* em pacientes com PV, TE e MFP em relação aos controles ($p=0.06$). As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta Ct}$) e foram realizadas por ANOVA com pós-teste de Tukey.

A presença da mutação $JAK2^{V617F}$ também não pareceu influenciar na expressão diferencial dos genes anti e/ou pró-apoptóticos da família BCL2 analisados ($BCL\text{-}xL$, $BCL2$ e BIM com valores de $p=0.68$; 0.70 e 0.45 , respectivamente) (Figura 16A-C).

Figura 16. Expressão dos genes $BCL\text{-}xL$, $BCL2$ e BIM por PCR em Tempo Real em células $CD34^+$ da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (PV, Policitemia Vera; TE, Trombocitemia essencial e MFP, Mielofibrose primária) portadores ou não da mutação $V617F$ e controles normais (CT). A, B e C. Não houve diferença significativa na expressão dos genes antiapoptóticos $BCL\text{-}xL$ ($p=0.68$) e $BCL2$ ($p=0.70$) e no pró-apoptótico BIM ($p=0.45$) nos pacientes portadores da mutação $JAK2^{V617F}$ ($n=10$) em relação aos $JAK2^{WT}$ ($n=10$) e controles ($n=13$), respectivamente. As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta C_t}$) e foram realizadas por ANOVA com pós-teste de Tukey.

Foram analisadas amostras das subpopulações de células $CD34^+CD38^{-/+}$ da medula óssea total de 13 pacientes e 8 controles (doadores de medula óssea saudáveis) por RT-PCR em Tempo Real quanto a expressão de $BCL\text{-}xL$, $BCL2$ e BIM .

Assim como na análise da expressão gênica em células CD34⁺, a análise dos genes antiapoptóticos *BCL-xL* e *BCL2* e do gene pró-apoptótico *BIM* não se mostrou diferencialmente expressa em relação aos controles quando se analisou as subpopulações de células CD34⁺CD38^{-/+} da medula óssea de todos os pacientes com NMPs.

Na subpopulação de células hematopoéticas precursoras imaturas, (CD34⁺CD38⁻) de pacientes com PV e MFP, observou-se uma tendência a maior expressão do gene antiapoptótico *BCL-xL* em relação às subpopulações de células precursoras mieloides mais maduras (CD34⁺CD38⁺) e aos controles em geral, apesar da falta de significância estatística ($p=0.14$). Vale ressaltar que esta diferença de expressão do gene *BCL-xL* não foi observada entre as duas subpopulações de células dos controles (Figura 17A).

Como pode ser visto na Figura 17B, a análise da expressão de *BCL2* sugeriu maior expressão deste gene nas duas subpopulações de CPH dos pacientes com PV em relação aos controles ($p=0.06$).

Observamos também uma tendência à menor expressão do gene pró-apoptótico *BIM* na subpopulação de células hematopoéticas precursoras imaturas, CD34⁺CD38⁻, em relação a de precursores mieloides mais maduros, CD34⁺CD38⁺, nos pacientes com TE e MFP, mas não nas mesmas subpopulações de indivíduos saudáveis, embora os dados não tenham alcançado significância estatística pelo ANOVA (Figura 17C, $p=0.86$). Mesmo utilizando-se o teste não-paramétrico Mann-Whitney entre os subgrupos de doenças (PV, TE e MFP), não conseguimos demonstrar significância estatística ($p>0.05$).

Figura 17. Expressão dos genes *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* por PCR em Tempo Real em subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas ($CD34^+CD38^-$) e precursores mieloides mais maduros ($CD34^+CD38^+$) da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (PV, Policitemia Vera; TE, Trombocitemia essencial e MFP, Mielofibrose primária) em relação aos controles normais (CT). A. Não houve diferença de expressão do gene *BCL-xL* na subpopulação de células $CD34^+CD38^-$ de pacientes com PV (n=2) e MFP (n=5) em relação aos controles (n=8) ($p=0.145$). B. Tendência a maior expressão do gene antiapoptótico *BCL2* na subpopulação de células $CD34^+CD38^-$ e $CD34^+CD38^+$ de pacientes com PV em relação aos controles ($p=0.06$). C. O gene pró-apoptótico *BIM* pareceu estar com menor expressão na subpopulação de células hematopoéticas precursoras imaturas, $CD34^+CD38^-$, em relação a de precursores mieloides mais maduros, $CD34^+CD38^+$, nos pacientes com TE e MFP (n=5), fato não observado em relação aos controles (CT) ($p=0.86$). As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta C_t}$) e foram realizadas por ANOVA e pós teste de Tukey.

Quando as amostras de subpopulações de células progenitoras de NMPs foram agrupadas de acordo com a presença ou não da mutação $JAK2^{V617F}$, não se observou diferença significativa de expressão dos genes antiapoptóticos *BCL-xL*, *BCL2* e do gene pró-apoptótico *BIM* em relação aos controles ou entre subpopulações

CD34⁺CD38[±] JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F} ($p=0.20$; 0.62 e 0.32, respectivamente; ANOVA)

(Figura 18A-C).

Figura 18. Expressão dos genes *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* por PCR em Tempo Real em subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas (CD34⁺CD38⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34⁺CD38⁺) da medula óssea de pacientes com neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2^{V617F} em relação às subpopulações de pacientes não portadores da mutação V617F (JAK2^{WT}) e controles normais (CT). **A**, **B** e **C**. Não houve diferença de expressão dos genes antiapoptóticos *BCL-xL*, *BCL2* e do gene pró-apoptótico *BIM* em relação aos controles ou entre subpopulações CD34⁺CD38[±] JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F} ($p=0.20$; 0.62 e 0.32, respectivamente). As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta Ct}$) e foram realizadas por ANOVA, pós-teste de Tukey).

A análise da expressão diferencial de *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* em células CD34⁺CD38[±] também foi realizada nos subgrupos de células de pacientes

portadores de PV, TE e MFP, com ou sem a mutação da JAK2^{V617F}, em relação aos controles.

O número de pacientes com PV com mutação da JAK2^{V617F} foi pequeno em nossa casuística devido ao seguinte: durante o período de coleta das amostras, foram selecionados 8 pacientes com diagnóstico provável ou já confirmado de PV, sem uso de terapia citorrredutora, 4 sabidamente portadores da mutação JAK2^{V617F} e 4 negativos para a mutação. Infelizmente, 2 amostras dos pacientes portadores da JAK2^{V617F} não foram analisadas (um paciente foi diagnosticado com MFP após revisão dos critérios diagnósticos; outro paciente foi excluído por amostra de má qualidade após o *sorting* para separação das subpopulações celulares). Amostras de 2 pacientes com PV portadores da JAK2^{V617F} e 4 pacientes com pesquisa negativa desta mutação foram analisadas, porém, não houve amplificação pelo PCR em Tempo Real de 2 amostras de cada grupo, impossibilitando esta análise.

Optamos por fazer comparações dos resultados de expressão gênica entre as subpopulações de progenitores definidas como CD34⁺CD38⁻ e CD34⁺CD38⁺ de cada um dos subgrupos de NMP (PV, TE e MFP) em relação às mesmas subpopulações dos controles normais.

Para PV, apenas duas amostras de PV JAK2^{V617F} negativas puderam ser comparadas às subpopulações normais (controles), devido aos motivos acima descritos, e não houve diferença de expressão em relação aos genes *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* ($p=0.49$, 0.16 e 0.95 , respectivamente) (Figura 19A-C).

Figura 19. Expressão dos genes *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* por PCR em Tempo Real em subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas (CD34⁺CD38⁻) e precursores mieloides mais maduros (CD34⁺CD38⁺) da medula óssea de pacientes com Policitemia vera não portadores da mutação V617F (JAK2^{WT}) em relação aos controles (CT). **A**, **B** e **C**. Não houve diferença de expressão em relação aos genes antiapoptóticos *BCL-xL* e *BCL2* e o gene pró-apoptótico *BIM* quando comparados aos controles ($p=0.49$, 0.16 e 0.95 , respectivamente). As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média 2^{-ΔΔCt}) e foram realizadas por ANOVA, pós-teste de Tukey.

Análise semelhante da expressão de *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* entre as subpopulações de pacientes portadores de TE não evidenciou diferença entre as subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas e mieloides mais maduras e controles no geral ($p=0.24$, 0.96 e 0.89 , respectivamente).

Nos pacientes portadores de MFP não houve diferença de expressão em relação ao *BCL-xL* e *BCL2* nas diferentes subpopulações de células precursoras hematopoéticas de pacientes e controles como observado na Figura 20A e 20B ($p=0.08$ e 0.96 , ANOVA).

Na análise do *BIM*, não houve diferença de expressão entre as duas subpopulações de células progenitoras hematopoéticas ($CD34^+CD38^{+/-}$) dos controles e entre as subpopulações de células de pacientes com MFP $JAK2^{V617F}$ e $JAK2^{WT}$. *BIM* mostrou-se diferencialmente expresso na subpopulação de células hematopoéticas precursoras imaturas de pacientes com MFP $JAK2^{WT}$ em relação a de precursores mieloides mais maduros dos pacientes com MFP $JAK2^{V617F}$ e controles, em geral ($p=0.03$, ANOVA; $p=0.04$, 0.03 e 0.02 , respectivamente no pós-teste de Turkey (Figura 20C).

Figura 20. Expressão dos genes *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* por PCR em Tempo Real em subpopulações de células hematopoéticas precursoras imaturas ($CD34^+CD38^-$) e precursores mieloides mais maduros ($CD34^+CD38^+$) da medula óssea de pacientes com Mielofibrose primária associadas ou não à mutação $JAK2^{V617F}$ e controles normais (CT). **A e B.** Não houve diferença de expressão do *BCL-xL* ($p=0.08$) e *BCL2* ($p=0.96$), nas subpopulações de células dos pacientes com MFP $JAK2^{V617F}$, $JAK2^{WT}$ ou controles. **C.** Não houve expressão diferencial de *BIM* nas duas subpopulações de células ($CD34^+CD38^{+/-}$) dos controles e pacientes portadores da mutação $JAK2^{V617F}$. Houve aumento da expressão de *BIM* ($p=0.03$) na subpopulação de células hematopoéticas precursoras imaturas $CD34^+CD38^-$ dos pacientes com MFP $JAK2^{WT}$ em relação a de precursores mieloides mais maduros $CD34^+CD38^+$ de pacientes com MFP $JAK2^{V617F}$ ($p=0.04$) e em relação as duas subpopulações de células precursoras hematopoéticas imaturas ($p=0.03$) e mais maduras dos controles ($p=0.02$). As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta Ct}$) e foram realizadas por ANOVA; pós-teste de Tukey.

4.3.2 Expressão diferencial dos genes *Bcl-xL*, *Bcl2* e *Bim* em células progenitoras hematopoéticas murinas Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt

A análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real de células mononucleares obtidas da medula óssea de camundongos transgênicos Jak2 wt/VF (PV) e Jak2 wt/wt (controles) evidenciou maior expressão do gene antiapoptótico *Bcl2* nas células mononucleares dos camundongos com fenótipo de NMP semelhante à PV humana em relação aos controles ($p=0.028$). Não houve diferença significativa em relação ao *Bcl-xL* e *Bim* ($p=0.08$ e $p=0.88$, respectivamente) (Figura 21A-C).

Figura 21. Expressão dos genes *Bcl-xL*, *Bcl2* e *Bim* por PCR em Tempo Real em células da medula óssea dos camundongos Jak2 wt/VF (n=4) e Jak2 wt/wt (n=4). **A.** Expressão comparativa de *Bcl-xL* em células mononucleares de animais Jak2 wt/wt e animais Jak2 wt/VF. **B.** Aumento de expressão do gene antiapoptótico *Bcl2* nas células mononucleares dos camundongos Jak2 wt/VF diferentemente do observado nos controles ($p=0.028$). **C.** Expressão de *Bim* em células Jak2 wt/VF em relação aos controles. As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta C_t}$). Teste de Mann-Whitney.

A análise da expressão gênica em células hematopoéticas precursoras imaturas (LSKs) e precursores mieloides mais maduros (MPs) obtidas da medula óssea de camundongos Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt (controles) após *sorting* mostrou maior expressão do gene antiapoptótico *Bcl-xL* nos precursores mieloides mais maduros (MPs) de camundongos wt/VF em relação à subpopulação de células mais imaturas (LSKs) e em relação às células LSKs e MPs dos controles como evidenciado na Figura 22A ($p=0.0011$, ANOVA; $p=0.018$, 0.008 e 0.006 , respectivamente, pós-teste de Tukey). Não houve diferença de expressão significativa do *Bcl2* ($p=0.12$), como observado na Figura 22B, apesar da tendência ao aumento da expressão deste gene nas células LSKs de animais portadores da mutação Jak2^{V617F} em relação às células MPs, fato não observado em relação as mesmas subpopulações dos controles. Encontramos redução da expressão do gene pró-apoptótico *Bim* na subpopulação de células LSKs em relação aos MPs de camundongos wt/VF e em relação aos controles como ilustrado na Figura 22C (ANOVA, $p=0.026$). A comparação entre cada grupo revelou menor expressão de *Bim* nas células LSK de animais Jak2 wt/VF em relação aos MPs dos mesmos e em relação às células MPs dos controles ($p=0.039$ e 0.036 , respectivamente). Quando se analisou a diferença de expressão entre as subpopulações de células mais imaturas, LSKs, bem como das subpopulações celulares mais diferenciadas, MPs, de camundongos Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt, não houve diferença significativa de expressão de *Bim* ($p=0.09$ e >0.99 , respectivamente).

Figura 22. Expressão dos genes *Bcl-xL*, *Bcl2* e *Bim* por PCR em Tempo Real em células hematopoéticas precursoras imaturas (LSKs) e precursores mieloides mais maduros (MPs) dos camundongos *Jak2* wt/VF e *Jak2* wt/wt (controle). A. Aumento de expressão do gene antiapoptótico *Bcl-xL* nos MPs de camundongos wt/VF em relação à subpopulação de células mais imaturas (LSKs) e em relação as duas subpopulações de células dos controles (ANOVA, $p=0.0011$). **B.** Não houve diferença significativa de expressão do gene antiapoptótico *Bcl2* na subpopulação de células LSKs em relação a MPs de camundongos wt/VF e em relação aos controles (ANOVA, $p=0.12$). **C.** A expressão do gene pró-apoptótico *Bim* na subpopulação de LSKs foi menor em relação aos MPs de camundongos wt/VF e controles ($p=0.026$). As comparações estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta Ct}$), $n=3$ para cada grupo. A análise foi realizada por ANOVA e pós-teste de Tukey, com valores de p definidos como: $*p<0.05$, $**p<0.01$ e $***p<0.001$.

Para avaliar os efeitos da inibição da JAK2 em células precursoras hematopoéticas murinas e controles, cultivadas *in vitro*, sobre a expressão diferencial dos genes da família BCL2, avaliamos a expressão dos genes antiapoptóticos *Bcl-xL* e *Bcl2* e do gene pró-apoptótico *Bim* por RT-PCR usando como molde cDNA obtido de CPH da medula óssea de camundongos Jak2 wt/VF (n=3) e Jak2 wt/wt (n=3, controles) após tratamento com veículo, inibidor da JAK1/2 (ruxolitinibe, 300 nM) e/ou inibidor BCL2 do tipo BH3-símile (obatoclax, 250 nM).

Não houve diferença significativa de expressão do gene antiapoptótico *Bcl-xL* entre os diferentes grupos analisados ($p=0.5$) como observado na Figura 23A. O tratamento isolado com inibidor de JAK1/2 ou droga BH3-símile resultou em aumento de expressão do gene pró-apoptótico *Bim* nas CPH de camundongos Jak2 wt/VF, portadores do fenótipo de PV, em relação aos controles. Houve ainda aumento da expressão de *Bim* após o tratamento das células com a combinação das duas drogas em relação aos controles e também em relação a todos os outros grupos tratados (veículo, ruxolitinibe e obatoclax) como ilustrado na Figura 23B ($p=0.0001$, ANOVA; $p<0.05$, pós-teste de Tukey). Não foi possível avaliar a expressão do *Bcl2* pelo número insuficiente de células.

Figura 23. Expressão dos genes *Bcl-xL* e *Bim*, em células precursoras hematopoéticas dos camundongos Jak2 wt/VF (PV) e Jak2 wt/wt (controle, CT) submetidas ao tratamento com veículo (V, DMSO), inibidor de JAK1/2 (ruxolitinibe 300nM) e/ou droga BH3-símile (obatoclastax 250nM). **A.** Não houve diferença significativa de expressão do gene antiapoptótico *Bcl-xL* ($p=0.5$). **B.** Aumento de expressão do gene pró-apoptótico *Bim* após tratamento com ruxolitinibe e/ou obatoclastax em relação aos controles e aos camundongos Jak2 wt/VF tratados isoladamente com veículo, ruxolitinibe e obatoclastax. As comparações entre os grupos estão indicadas pelas linhas horizontais (média $2^{-\Delta\Delta C_t}$), $n=3$ para cada grupo. A análise foi realizada por ANOVA e pós-teste de Tukey, com valores de p definidos como: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ e **** $p<0.0001$.

4.4 Avaliação de apoptose

Para determinar se a inibição da família BCL2 (com o inibidor de BCL2 obatoclax) isoladamente ou em combinação à inibição da JAK2 (com ruxolitinibe), teria efeito sobre a indução de apoptose mediada por estas drogas, células da medula óssea murina de animais Jak2V617F e controles foram cultivadas e tratadas, nas condições anteriormente já descritas, por 24 horas. Posteriormente, as células foram recuperadas da placa de cultivo e marcadas com anticorpos monoclonais definidores das subpopulações de precursores hematopoéticos e com anexina V e 7-AAD para análise da viabilidade celular por meio de citometria de fluxo.

Quando analisamos a percentagem de células em apoptose tardia (ou seja, maior percentagem de células com incorporação simultânea de anexina V e 7-AAD), tivemos os seguintes resultados:

Nos animais controles (Jak2 wt/wt), o tratamento com as drogas na população de LSKs ou MPs não alterou significativamente a apoptose ($p=0.781$ e $p=0.509$, respectivamente, na análise por ANOVA). Entretanto, teste t pareado comparando as populações LSKs e MPs em cada tratamento mostrou que as LSKs são mais resistentes à apoptose do que as células MPs ($p<0.001$). De forma semelhante, a análise de variância também não mostrou diferenças significativas entre os vários tratamentos em LSKs ou MPs de animais Jak2 wt/VF ($p=0.322$ e $p=0.957$, respectivamente). Porém, também nos animais doentes (Jak2 wt/VF) a apoptose foi mais pronunciada na subpopulação MP do que em LSKs ($p=0.003$) (Figuras 24A e 24B).

Nossos resultados sugeriram que há maior apoptose tardia nos animais Jak2 wt/VF em relação aos Jak2 wt/wt (controles) mesmo na ausência de tratamento. Tal

fato foi observado tanto nas células mais imaturas (LSKs) como na subpopulação de células progenitoras mais diferenciadas (MPs), quando cultivadas apenas com veículo. Não encontramos diferença estatística no efeito pró-apoptótico das drogas entre animais controles e Jak2 wt/VF nos grupos tratados com veículo, droga BH3-*similar*, inibidor de JAK2 ou a combinação das duas drogas. Esta conclusão foi obtida por análise pareada em cada grupo de tratamento quando se compara LSKs de animais Jak2 wt/VF com animais Jak2 wt/wt ($p=0.161$, $p=0.400$, $p=0.675$ e $p=0.471$, nas quatro condições de tratamento, respectivamente); bem como na comparação de MPs de animais Jak2 wt/VF com animais Jak2 wt/wt ($p=0.254$, $p=0.979$, $p=0.997$ e $p=0.991$, respectivamente). Mesmo agrupando as LSKs ou MPs tratadas com as quatro condições, não houve diferença entre apoptose induzida em células LSK ($p=0.278$) ou MP ($p=0.566$) quando as populações Jak2 mutadas foram comparadas com as populações Jak2 selvagens. (Figuras 24C e 24D). Ademais, observamos tendência de melhor efeito pró-apoptótico do obatoclax em relação ao ruxolitinibe em células LSKs de animais Jak2 wt/VF, fato não observado para os animais Jak2 wt/wt, e um aparente efeito potencializador com a combinação das duas drogas (Figura 24C).

Figura 24. Avaliação de apoptose tardia. As células progenitoras hematopoéticas de animais Jak2 wt/wt (controle, n=3) e Jak2 wt/VF (n=3) foram tratadas *in vitro* com veículo (controle), obatoclox 250 nM e/ou ruxolitinibe 300 nM por 24 horas e então foram submetidas à análise de apoptose por citometria de fluxo nas subpopulações de células progenitoras mais imaturas (LSKs) e mais maduras (MPs) após marcação com anticorpos biotinilados definidores de linhagem seguida da marcação com anticorpos fluorescentes anti-estreptavidina, ckit, Sca-1, Annexina V e 7-AAD. As células LSK se mostraram mais resistentes à apoptose tanto nos animais controle (**A**) como nos portadores de mutação da Jak2^{V617F} (**B**) ($p < 0.001$ e $p = 0.003$, respectivamente, teste t pareado entre as subpopulações em cada grupo de tratamento). **C, D.** Em condições basais, observou-se maior apoptose tardia nos animais Jak2 wt/VF em relação aos Jak2 wt/wt tanto nas células mais imaturas (LSKs) como na subpopulação de células progenitoras mais diferenciadas (MPs). Embora não tenha havido significância estatística, o obatoclox pareceu ter efeito pró-apoptótico maior em células LSKs de animais Jak2 wt/VF em relação aos controles. As análises representam a média $\pm$ desvio padrão e foram realizadas por ANOVA quando a apoptose foi aferida entre os vários grupos de tratamento ou por teste t pareado nas comparações entre variáveis dependentes (subpopulações LSK e MP de um mesmo animal).

O tratamento com inibidor de JAK2 e droga BH3-*símile* ocasionou, de forma semelhante, apoptose precoce (ou seja, percentagem de células anexina V positivas) nas duas subpopulações de CPH (MP e LSK) de animais controles e Jak2 wt/VF, como observado nas Figuras 25 A-D. Na subpopulação de MPs, nenhum dos tratamentos levou a diferenças significantes de indução de apoptose, muito provavelmente devido à elevada percentagem de células apoptóticas no estado basal (tratadas apenas com veículo) ($p=0.303$ para MPs de animais Jak2 wt/wt e $p=0.519$ para MPs de animais Jak2 wt/VF, ANOVA). Nas LSKs de animais controles e Jak2 wt/VF, os tratamentos também não induziram apoptose de forma significativa em relação aos controles ($p=0.048$ e $p=0.665$, respectivamente). A apoptose precoce também não foi diferente entre LSKs e MPs de animais controle e LSKs e MPs de animais Jak2 wt/VF ($p=0.067$ e $p=0.582$, teste t pareado nos vários grupos de tratamento) (Figuras 25A e 25B). Quando a percentagem de apoptose entre células LSK de camundongos controles e Jak2 wt/VF foi comparada em cada grupo de tratamento, não encontramos diferenças relevantes em relação à apoptose precoce. Em contrapartida, nas células MPs, embora tenha se observado uma tendência à maior apoptose nos animais wt/VF em relação aos animais controles no estado basal ($p=0.072$), o tratamento com obatoclax resultou em indução de apoptose ($p=0.036$), diferentemente do que foi observado com o tratamento com ruxolitinibe ($p=0.594$). Ademais, o tratamento combinado com ruxolitinibe e obatoclax resultou em mais apoptose nas células MPs dos animais com fenótipo de PV (Jak2 wt/VF) em relação aos animais Jak2 wt/wt ($p=0.05$) (Figuras 25C e 25D).

Figura 25. Avaliação de apoptose precoce. As células progenitoras hematopoéticas de animais *Jak2 wt/wt* (controle, $n=3$) e *Jak2 wt/VF* ($n=3$) foram tratadas *in vitro* com veículo (controle), obatoclox 250 nM e/ou ruxolitinibe 300 nM por 24 horas e então foram submetidas à análise de apoptose por citometria de fluxo nas subpopulações de células progenitoras mais imaturas (LSKs) e mais maduras (MPs) após marcação com anticorpos biotinilados definidores de linhagem seguida da marcação com anticorpos fluorescentes anti-estreptavidina, ckit, Sca-1, Annexina V e 7-AAD. **A e B.** O tratamento com as drogas não resultou em indução de apoptose significativa em relação ao controle nas subpopulações LSK ou MP. Também não se observou diferença na apoptose induzida nas LSKs em comparação às MPs nos animais controles ou portadores da mutação da *Jak2V617F*. Embora não tenham se observado diferenças entre as percentagens de apoptose precoce nas células LSK de animais controles e *Jak2 wt/VF* (**C**), nas células definidas como MPs, o tratamento com obatoclox resultou em indução de apoptose ($p=0.036$), diferentemente do que foi observado com o tratamento com ruxolitinibe ($p=0.594$); e o tratamento combinado com ruxolitinibe e obatoclox resultou em mais apoptose nas células MP *Jak2 wt/VF* do que em MP *Jak2 wt/wt* ($p=0.05$) (**D**). As análises representam a média $\pm$ desvio padrão e foram realizadas por ANOVA quando a apoptose foi aferida entre os vários grupos de tratamento ou por teste t pareado nas comparações entre variáveis dependentes (subpopulações LSK e MP de um mesmo animal).

4.5 Ensaio de formação de colônias

A avaliação do efeito da inibição da família BCL2 (com o inibidor de BCL2 obatoclax), isoladamente ou em combinação à inibição da JAK2 (com ruxolitinibe), por meio do tratamento *in vitro* de células precursoras hematopoéticas murinas Jak2^{V617F} e Jak2^{WT}, sobre o potencial clonogênico destas células, foi realizada por meio de cultura em meio semi-sólido de metilcelulose. As colônias foram contadas em microscópio invertido após 10 dias de cultivo e classificadas de acordo com sua morfologia em CFU-GM (Unidade formadora de colônias granulócitos/monócitos), CFU-G (Unidade formadora de colônias granulócitos), CFU-M (Unidade formadora de colônias monócitos), BFU-E (Unidade formadora de colônias eritróide) e CFU-GEMM (Unidade formadora de colônias granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos).

A análise por ANOVA não evidenciou diferença em relação ao número total de colônias nas diversas condições ($p>0.05$). Porém, houve redução do número de todas as colônias nos animais Jak2 wt/VF tratados com o uso isolado de obatoclax ($p>0.05$) bem como com a combinação do inibidor de JAK 1/2 (ruxolitinibe) e droga BH3-*símile* (obatoclax) ($p>0.05$) (Figura 26A e 26B).

Figura 26. Ensaio de formação de colônia. Células de medula óssea total de animais Jak2 wt/wt (**A**, controle, n=3) e Jak2 wt/VF (**B**, n=3) foram cultivadas em meio de metilcelulose e tratadas com veículo (CT, controle), ruxolitinibe 300 nM e/ou obatoclox 250 nM. Após 10 dias de cultivo, as colônias foram classificadas de acordo com sua morfologia em CFU-GM (Unidade formadora de colônias granulócitos/monócitos), CFU-G (Unidade formadora de colônias granulócitos), CFU-M (Unidade formadora de colônias monócitos), BFU-E (Unidade formadora de colônias eritróide) e CFU-GEMM (Unidade formadora de colônias granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos) ($p > 0.05$). As barras representam a média de cada tipo de colônia, conforme ilustrada pelas diferentes cores e as análises foram realizadas por ANOVA.

5 DISCUSSÃO

O tratamento das neoplasias mieloproliferativas (NMP) associadas à mutação da JAK2^{V617F} permanece não curativo com as estratégias disponíveis até o momento a despeito do desenvolvimento de drogas inibidoras da JAK2, as quais melhoram os sintomas da doença mas não diminuem eficazmente a carga alélica da mutação ou eliminam o clone de células tronco hematopoéticas anormal (Quintás-Cardama *et al.*, 2010; Verstovsek *et al.*, 2010). Dados recentes obtidos com ensaios *in vitro* mostram que as proteínas da família BCL2, reguladoras da apoptose mitocondrial, desempenham um papel relevante na patogênese das NMP (Zeuner *et al.*, 2009; Will *et al.*, 2010). Entretanto, até o presente momento, a expressão diferencial da família BCL2 nas diversas subpopulações de progenitores hematopoéticos em células primárias murinas ou humanas portadoras da mutação JAK2^{V617F} é desconhecida, assim como a sua contribuição para o fenótipo da doença. Estudos mostram que a mutação JAK2^{V617F} ocorre nas células-tronco hematopoéticas (CTH), enquanto os precursores mielóeritroides expandem, resultando em excessiva produção das hemácias do sangue periférico (Zhao *et al.*, 2005; Delhommeau *et al.*, 2010). Esses dados nos levam a inferir que as diversas populações de precursores hematopoéticos tem papéis distintos na patogênese das NMP, sendo que as CTH mais primitivas iniciariam a doença e os precursores mielóides e seus derivados eritrocitários, granulocitários e megacariocitários têm um papel relevante na expansão e determinação do fenótipo da doença.

Utilizamos um modelo *knockin* de expressão heterozigótica condicional da Jak2^{V617F} e células da medula óssea de pacientes portadores de NMP e controles saudáveis, para explorar a possibilidade de que a modulação da família BCL2 seja um novo alvo terapêutico para as NMPs.

Verificamos através de RT-PCR a expressão dos genes antiapoptóticos *BCL-xL* e *BCL2* e do gene pró-apoptótico *BIM* nas CPH CD34⁺ da medula óssea e das subpopulações de células CD34⁺CD38^{-/+}, obtidas por *sorting*, de pacientes e controles (doadores de medula óssea saudáveis). Não encontramos diferenças na expressão dos genes avaliados nas CPH CD34⁺ de pacientes portadores de NMPs (PV, MFP e TE) quando analisadas conjuntamente em relação aos controles. Células CD34⁺ de pacientes portadores de TE apresentaram maior expressão do gene antiapoptótico *BCL2* em relação às células CD34⁺ dos pacientes com MFP ($p=0.02$) e com tendência a maior expressão quando comparado aos controles.

A expressão diferencial em células CD34⁺ e leucócitos de pacientes com NMP já havia sido relatada por outros autores que descreveram a alteração da expressão dos genes antiapoptóticos *BCL2*, *CIAP2*, *CIAP1*, *C-FLIP* e *A1*; e nos pró-apoptóticos, *FAS* e *BAX* que controlam a apoptose em pacientes com PV (Gasparotto *et al.* 2011). Da mesma forma, Tognon e colaboradores descreveram o aumento da expressão dos genes antiapoptóticos *A1*, *BCL-2*, *BCL-XL* e *BCL-W* e diminuição da expressão dos genes *BID* e *BIM^{EL}* nos leucócitos de TE e MFP (Tognon *et al.* 2012). Outros estudos relataram o aumento de expressão de *BCL-xL* em precursors eritroides de pacientes com PV (Silva *et al.* 1998). A desregulação da família BCL2 em CPH CD34⁺ também já foi descrita na fisiopatogenia de várias outras neoplasias hematológicas como Leucemia linfocítica crônica (LLC), Mieloma múltiplo e leucemias agudas e também são estudadas como alvo terapêutico (Hussain *et al.*, 2007; Trudel *et al.*, 2007; Lagadinou *et al.*, 2013; Waibel *et al.*, 2013). Na LLC, por exemplo, foi aprovado recentemente o uso do inibidor de BCL2 Venetoclax para pacientes portadores da deleção no 17p (Paulus *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

Não encontramos diferença de expressão dos genes antiapoptóticos *BCL-xL*, *BCL2* e do gene pró-apoptótico *BIM* nas subpopulações de células progenitoras ($CD34^+CD38^{+/-}$) de pacientes com NMPs, em geral, quando foram conjuntamente agrupadas de acordo com a presença ou não da mutação $JAK2^{V617F}$. Tal fato pode justificar-se pelo número pequeno de pacientes envolvidos no estudo bem como pela heterogeneidade de cada uma das NMPs, as quais têm fenótipos variados a depender do perfil de mutacional. Há evidências de que a carga alélica da mutação $JAK2^{V617F}$ tem correlação com a desregulação da via intrínseca da apoptose mediada pela família BCL2. De acordo com Zeuner e colaboradores, a média da expressão das proteínas BCL2 e BCL-xL em eritroblastos de pacientes portadores de PV com baixa carga alélica da mutação $JAK2^{V617F}$ e de controles foi comparável; enquanto os níveis de BCL2 e BCL-xL foram mais altos em eritroblastos de pacientes portadores de PV com alta carga alélica da mutação $JAK2^{V617F}$. Ainda, os eritroblastos de pacientes com maior carga mutacional foram mais resistentes que os eritroblastos normais à apoptose induzida por agentes mielossupressores (citarabina e hidroxiureia) (Zeuner *et al.*, 2009).

Avaliamos, de forma inédita, a expressão diferencial de *BCL-xL*, *BCL2* e *BIM* nas subpopulações de células precursoras mais imaturas ($CD34^+CD38^-$) e células precursoras mieloides mais maduras ($CD34^+CD38^+$) de pacientes portadores de NMPs. Não encontramos diferença de expressão dos genes analisados nas subpopulações de CPH quando o conjunto de pacientes com NMP foi avaliado em relação aos controles; bem como, quando a análise foi realizada de acordo com o *status* da mutação $JAK2^{V617F}$. Pareceu haver, nas células hematopoéticas precursoras imaturas, $CD34^+CD38^-$, de pacientes com PV e MFP maior expressão do gene antiapoptótico *BCL-xL* em relação às subpopulações de células precursoras mieloides

mais maduras, CD34⁺CD38⁺, e aos controles no geral. Esta diferença de expressão do gene *BCL-xL* não foi observada entre as duas subpopulações de células dos controles. Esse resultado sugere que as células iniciadoras da doença possam ter maior resistência à apoptose, podendo escapar ao tratamento de inibição da via JAK/STAT e impedindo a eliminação do clone leucêmico. Assim, o tratamento alvo disponível seria capaz de reduzir substancialmente os mieloprogenitores responsáveis pelo fenótipo clínico da NMP, mas não teria ação significativa ao nível da célula-tronco leucêmica.

A falta de significância estatística em muitas das análises pode ser justificada pelo número pequeno de pacientes selecionados para o estudo (foram selecionadas amostras de medula óssea de pacientes sem tratamento citorredutor, no momento da avaliação para diagnóstico, podendo ser ainda descartadas se outros achados não confirmassem o diagnóstico de NMP) bem como pela raridade das células estudadas nesse grupo de pacientes.

A seguir, a análise entre as duas subpopulações CD34⁺CD38^{-/+} foi realizada de forma a comparar cada um dos tipos de NMP (PV, TE e MFP) com os controles normais. Diferenças não foram detectadas para a expressão dos genes da família *BCL2* em PV e TE. Nos pacientes portadores de MFP JAK2^{WT}, observamos tendência a maior expressão do gene antiapoptótico *BCL-xL* na subpopulação de células CD34⁺CD38⁻ em relação a de precursores mieloides mais maduros, CD34⁺CD38⁺, fato não observado em relação aos controles e pacientes com JAK2^{V617F}. Na análise do gene *BIM*, não encontramos diferença de expressão entre as duas subpopulações de células progenitoras hematopoéticas dos controles e entre as subpopulações de células de pacientes com MFP JAK2^{V617F}. Por outro lado, observamos menor expressão de *BIM*, pro-apoptótico, em células precursoras CD34⁺CD38⁻ e células

CD34⁺CD38⁺ de pacientes com MFP portadores da mutação JAK2V617F em relação às células imaturas CD34⁺CD38⁻ de pacientes com MFP sem esta mutação. Os achados indicam que células precursoras hematopoéticas de MFP JAK2V617F positivas tenham maior proteção à apoptose e, conseqüentemente, vantagem de sobrevivência em relação aos precursores presentes em pacientes sem a mutação JAK2. Em concordância, sabe-se que a presença da mutação JAK2V617F carrega implicação prognóstica em pacientes com TE e MFP (Tefferi, Lasho, *et al.*, 2014).

Os resultados destas análises de expressão gênica em pacientes tiveram sua interpretação dificultada pelo pequeno número de amostras estudadas em razão do número de pacientes incluídos ou da obtenção de células em número suficiente para os ensaios pretendidos. O aumento da casuística poderá esclarecer os achados que não foram significantes.

No modelo murino condicional Jak2V617F, de forma semelhante aos dados obtidos em células CD34⁺ de pacientes com TE, que apresentaram tendência ao aumento de expressão do gene antiapoptótico *BCL2* em relação aos controles normais, verificamos maior expressão de *Bcl2* nas células mononucleares dos camundongos Jak2 wt/VF, com fenótipo de PV, em relação aos camundongos Jak2 wt/wt, controles.

Da mesma forma que para os pacientes, avaliamos a expressão gênica nas subpopulações de células precursoras mais imaturas (LSKs) e precursores mieloides mais maduros (MPs) dos camundongos Jak2 wt/VF em relação aos Jak2 wt/wt (controles) obtidas por *sorting*. Houve maior expressão do gene antiapoptótico *Bcl-xL* nos precursores mieloides mais maduros (MPs) de camundongos wt/VF em relação às subpopulações de células mais imaturas (LSKs) e às duas subpopulações dos controles. O gene pró-apoptótico *Bim* apresentou-se menos expresso na

subpopulação de células LSKs em relação aos MPs de camundongos wt/VF e em relação aos controles. Assim, podemos inferir que Bcl-xL confere maior resistência à apoptose nos mieloprogenitores e Bim, por sua vez, participa principalmente da proteção à apoptose e vantagem de sobrevivência presente nas células LSKs que contêm as células-tronco iniciadoras da NMP de animais Jak2^{V617F}. Este achado parece específico do modelo de NMP estudado já que não houve diferença de expressão entre as duas subpopulações, LSKs e MPs, dos animais controles (Jak2 wt/wt).

Diante da desregulação na expressão dos genes da família BCL2, procuramos avaliar os efeitos da inibição da JAK2 (com ruxolitinibe) em células precursoras hematopoéticas murinas e controles, cultivados *in vitro*, sobre a expressão diferencial dos genes da família BCL2. O tratamento resultou em aumento da expressão do gene pró-apoptótico *Bim* nos camundongos Jak2 wt/VF em relação aos controles. Esse resultado sugere que o inibidor de JAK1/2 é capaz de reverter a inibição da expressão de Bim nas células LSK Jak2 wt/VF e, portanto, favorecer a apoptose destas células. Em nosso estudo, não houve alteração na expressão do gene antiapoptótico estudado, o *Bcl-xL*. Gozgit e colaboradores demonstraram que a inibição de JAK2 resultou em diminuição da fosforilação da via STAT3/5 e inibição da proliferação celular por meio da supressão de *BCL-xL* em linhagens celulares que expressam a mutação JAK2^{V617F} (SET-2) (Gozgit *et al.*, 2008). Rubert e colaboradores demonstraram que a inibição das caspases em células e linhagens celulares de origem humana portadoras da mutação JAK2^{V617F} (pacientes com LMA secundária a TE ou MFP, SET-2 e MB-02, respectivamente), aumentou a expressão de BIM após a inibição de JAK2 e redução de MCL-1, além de BCL-xL (Rubert *et al.*, 2011).

A inibição da família BCL2 (com obatoclax) por meio do tratamento, *in vitro*, de CPH em associação à inibição de JAK2 levou ao aumento da expressão do gene pró-

apoptótico *Bim* em relação aos controles e a todos os outros grupos tratados em monoterapia (veículo, ruxolitinibe e obatoclax). Dessa forma, os inibidores de BCL2 e JAK1/2 parecem colaborar na promoção de apoptose de CPH portadoras da mutação JAK2^{V617F}, sendo que o tratamento com obatoclax ou combinação das drogas resultou em aumento da expressão de *Bim* visivelmente maior nas células mutadas do que em células normais. O uso de obatoclax como monoterapia tem sido estudado em várias malignidades hematológicas e parece levar não apenas à indução de apoptose mas também à parada do ciclo celular e redução do potencial clonogênico em leucemias agudas, leucemia linfocítica crônica e mieloma múltiplo. Parikh e colaboradores, em um estudo pequeno fase II, avaliaram a eficácia clínica do tratamento em monoterapia com obatoclax em pacientes com MFP com resultados pouco satisfatórios (Parikh *et al.* 2010). O uso de drogas BH3-*símile* em combinação a outras drogas tem demonstrado efeito sinérgico no tratamento de doenças quimiorresistentes e foi capaz de restaurar a sensibilidade à dexametasona, melfalano e rituximabe (Trudel *et al.*, 2007; Goard e Schimmer, 2013).

Nossos achados sugerem maior resistência à apoptose mitocondrial, com maior vantagem de sobrevida celular, principalmente na subpopulação de células precursoras mais imaturas (CD34⁺CD38⁻ ou LSKs) de pacientes portadores de NMP e camundongos Jak2 wt/VF, iniciadoras das doenças, em relação às células efetoras, que seriam responsáveis pela diferenciação e fenótipo da doença, corroborando nossa hipótese inicial.

O efeito do tratamento, *in vitro*, por meio da inibição da família BCL2 (com obatoclax) isoladamente ou em combinação à inibição da JAK2 (com ruxolitinibe) sobre a indução de apoptose foi avaliado por citometria de fluxo após marcação das células da medula óssea murina de animais Jak2V617F e controles, com anexina V e

7-AAD. Os resultados apontaram maior resistência das LSKs à apoptose tardia, com maior apoptose na população de células mais diferenciadas, MPs, tanto nos animais Jak2 wt/VF quanto nos Jak2 wt/wt (controles). Não conseguimos demonstrar resistência à apoptose nas células LSKs ou MPs dos animais Jak2 wt/VF em relação aos animais saudáveis. Porém, observamos tendência de melhor efeito pró-apoptótico do obatoclax em relação ao ruxolitinibe em células LSKs de animais Jak2 wt/VF, fato não observado para os animais Jak2 wt/wt, e um aparente efeito sinérgico com a combinação das duas drogas.

Em relação à ocorrência de apoptose precoce nas duas subpopulações de CPH (MP e LSK) de animais controles e Jak2 wt/VF, nenhum dos tratamentos levou a diferenças significantes de indução de apoptose, muito provavelmente devido à elevada percentagem de células apoptóticas no estado basal (tratadas apenas com veículo). Nas células MPs, embora tenha se observado uma tendência à maior apoptose nos animais wt/VF em relação aos animais controles no estado basal, o tratamento com obatoclax resultou em indução de apoptose, diferentemente do que foi observado com o tratamento com ruxolitinibe. O tratamento combinado com ruxolitinibe e obatoclax resultou em mais apoptose nas células MPs dos animais com fenótipo de PV (Jak2 wt/VF) em relação aos animais Jak2 wt/wt. Não houve diferenças na análise das células LSKs de camundongos controles e Jak2 wt/VF.

Os achados sugeridos na avaliação de apoptose são concordantes com os resultados obtidos na avaliação da expressão gênica onde se constatou menor expressão basal do gene pró-apoptótico *Bim* na subpopulação de células LSKs em relação as MPs, com maior vantagem de sobrevida no primeiro grupo e ainda, pela análise de expressão gênica após o tratamento com inibidor de JAK2 em combinação

a droga BH3-*símile* que foi capaz de aumentar a expressão do gene pró-apoptótico *Bim* em relação a monoterapia com ruxolitinibe ou obatoclax.

Guo e colaboradores demonstraram que em linhagens celulares que expressam a mutação JAK2^{V617F} (SET-2, UKE-1 e HEL) ou não (K562 e MV4;11) a redução dos níveis de Mcl-1 através da inibição da JAK2 sensibilizou as células ao uso do inibidor de BCL2, ABT-263, indicando que as proteínas da família BCL2, tais como BCL-xL e BCL2, são necessárias para manter a viabilidade celular quando os níveis de Mcl-1 são reduzidos (Guo *et al.* 2015). Estudos com inibidores de aurora-quinase (VX-680) associado com um inibidor de JAK2 (TG101209) mostrou redução sinérgica da proliferação de linhagens celulares portadoras da mutação JAK2^{V617F}. Também em linhagens de células portadoras da mutação JAK2^{V617F}, a associação de inibidor de JAK2 em combinação com a supressão das vias PI3K/Akt ou mTOR reduziu de maneira sinérgica a proliferação celular (Bogani *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2015).

Demonstrou-se em células de um modelo murino de LLA-T *TEL-JAK2* que a combinação do inibidor de BCL2/BCL-xL (ABT-737) com inibidores de JAK2 proporcionou regressão e cura prolongada. A associação ainda foi capaz de reduzir a resistência adquirida ao tratamento com inibidor de JAK2 por efeito sinérgico (Waibel *et al.* 2013). Em células de linhagem celular derivadas de pacientes portadores de LMA (KG1a e Kasumi-1) e células CD34⁺ primárias de pacientes com LMA, o uso do inibidor de pan-BCL2, AT101, demonstrou atividade citotóxica por meio da ativação da via intrínseca da apoptose mitocondrial e da indução de dano ao DNA, diferentemente do observado em células CD34⁺ de doadores saudáveis de medula óssea (Zhang *et al.*, 2017).

A avaliação do tratamento com inibidor de BCL2 e inibidor de JAK2 sob o crescimento clonal, característica primária da CTH, foi realizada por meio do ensaio de formação de colônias. Em nosso estudo, houve tendência de redução do número das colônias de CFU-GM, CFU-G, CFU-M, BFU-E e CFU-GEMM nos animais Jak2 wt/VF tratados com a combinação do inibidor de JAK 1/2 (ruxolitinibe) e droga BH3-*símile* (obatoclax), principalmente no grupo tratado com o uso isolado de obatoclax. Em concordância com nossos achados, Will e colaboradores relataram que a inibição de BCL-xL com uso de droga BH3-*símile* (ABT-737) e da JAK2 levou à apoptose em linhagens celulares HEL e SET-2 portadoras da mutação JAK2^{V617F}. A combinação reduziu o número de colônias eritroides derivadas de células CD34⁺ isoladas do sangue periférico de pacientes com PV portadores da mutação JAK2^{V617F} mais eficientemente do que qualquer dos fármacos isoladamente (Will *et al.* 2010).

Conjuntamente, os achados deste trabalho podem contribuir para o entendimento da ação modesta do tratamento com inibidores da JAK2 disponíveis e aprovados até o momento, tanto na redução da carga alélica da mutação JAK2^{V617F} como na eliminação de um clone leucêmico resistente à apoptose. Também contribuem para agregar conhecimento aos mecanismos de iniciação e progressão tumoral e resistência a vários tratamentos em monoterapia como sugerem outros estudos. Ademais, sabe-se que o tratamento a longo prazo de NMP com ruxolitinibe pode resultar no crescimento de células tumorais resistentes aos fármacos que agem na modulação da via de sinalização JAK-STAT (Koppikar *et al.*, 2012; Waibel *et al.*, 2013). Dessa forma, a descoberta de alvos alternativos que possam ter efeito isolado ou sinérgico nessas doenças é de extrema valia.

Por fim, nossos resultados sugeriram a possibilidade de que a modulação da apoptose mitocondrial possa ser uma nova estratégia terapêutica para pacientes com

NMP associadas a mutação JAK2^{V617F} em combinação aos inibidores de JAK2, em casos resistentes, por atuação na fase de iniciação/efetora da doença.

6 CONCLUSÕES

- Estudamos pela primeira vez a expressão gênica diferencial da família BCL2, envolvida na apoptose mitocondrial, na subpopulação de células precursoras imaturas e mieloprogenitores mais maduros de pacientes portadores de NMPs (PV, TE ou MFP) e controles e ainda em um modelo murino *knockin* de expressão heterozigótica condicional da Jak2^{V617F}.
- A expressão de *BCL2* (*Bcl2*) e *BCL-XL* (*Bcl-xL*) em células CD34⁺ de pacientes portadores de TE e de camundongos Jak2 wt/VF mostrou-se aumentada em relação às células CD34⁺ de pacientes portadores de MFP e em relação aos camundongos Jak2 wt/wt (controles), respectivamente.
- Em camundongos transgênicos Jak2 wt/VF, observamos que o gene antiapoptótico *Bcl-xL* apresentou maior expressão na população de células mais diferenciadas, MPs, em relação às células mais imaturas, LSKs, e controles; ademais, encontramos menor expressão do gene pró-apoptótico *Bim* na subpopulação de células LSKs em relação às MPs nos camundongos mutados portadores do fenótipo de PV em relação aos controles.
- A associação do inibidor de JAK1/2 ao inibidor da família BCL2, obatoclax, para tratamento de células precursoras hematopoéticas de camundongos Jak2 wt/VF resultou em aumento da expressão do gene pró-apoptótico *Bim* em relação aos controles Jak2 wt/wt e a aos outros grupos tratados em monoterapia.
- As células LSKs foram mais resistentes à apoptose tardia induzida pela inibição *in vitro* da família BCL2 (com obatoclax) isoladamente ou em

combinação à inibição da JAK2 (com ruxolitinibe) do que as células MPs independente da mutação da JAK2.

- A avaliação do potencial clonogênico sugeriu redução do número das colônias CFU-GM, CFU-G, CFU-M, BFU-E e CFU-GEMM derivadas de células progenitoras da medula óssea de animais Jak2 wt/VF tratadas com a droga BH3-*símile* (obatoclax) ou combinação desta droga com o inibidor de JAK 1/2 (ruxolitinibe).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes & development**, v. 17, n. 20, p. 2481-2495, 2003. ISSN 0890-9369.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 5, p. 488-496, 2007. ISSN 0952-7915.
- AKASHI, K. et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 193, 2000. ISSN 0028-0836.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, p. blood-2016-03-643544, 2016. ISSN 0006-4971.
- 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, 2005. ISSN 0140-6736.
- BEER, P. A. et al. How I treat essential thrombocythemia. **Blood**, v. 117, n. 5, p. 1472-1482, 2011. ISSN 0006-4971.
- 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, 2013. ISSN 1932-6203.
- CAZZOLA, M. Mutant calreticulin: when a chaperone becomes intrusive. **Blood**, v. 127, n. 10, p. 1219-1221, 2016. ISSN 0006-4971.
- CERVANTES, F. How I treat myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 17, p. 2635-2642, 2014. ISSN 0006-4971.
- COSTA, D. B. et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. **PLoS medicine**, v. 4, n. 10, p. e315, 2007. ISSN 1549-1676.
- CRAGG, M. S. et al. Treatment of B-RAF mutant human tumor cells with a MEK inhibitor requires Bim and is enhanced by a BH3 mimetic. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 11, p. 3651, 2008.
- DELHOMMEAU, F. et al. Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. **International journal of hematology**, v. 91, n. 2, p. 165-173, 2010. ISSN 0925-5710.
- DENG, J. et al. Proapoptotic BH3-only BCL-2 family protein BIM connects death signaling from epidermal growth factor receptor inhibition to the mitochondrion. **Cancer research**, v. 67, n. 24, p. 11867-11875, 2007. ISSN 0008-5472.

DOMEN, J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cells and other hematopoietic cells show broad resistance to chemotherapeutic agents in vivo when overexpressing bcl-2. **Experimental hematology**, v. 31, n. 7, p. 631-639, 2003. ISSN 0301-472X.

FRUCHTMAN, S. M. et al. From efficacy to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. *Seminars in hematology*, 1997. p.17-23.

GARÇON, L. et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1551-1554, 2006. ISSN 0006-4971.

GEORGIADES, P. et al. VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. **genesis**, v. 34, n. 4, p. 251-256, 2002. ISSN 1526-968X.

GOARD, C. A.; SCHIMMER, A. D. An evidence-based review of obatoclox mesylate in the treatment of hematological malignancies. **Core evidence**, v. 8, p. 15, 2013.

GOFF, D. J. et al. A Pan-BCL2 inhibitor renders bone-marrow-resident human leukemia stem cells sensitive to tyrosine kinase inhibition. **Cell stem cell**, v. 12, n. 3, p. 316-328, 2013. ISSN 1934-5909.

GOZGIT, J. M. et al. Effects of the JAK2 inhibitor, AZ960, on Pim/BAD/BCL-xL survival signaling in the human JAK2 V617F cell line SET-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 47, p. 32334-32343, 2008. ISSN 0021-9258.

GUGLIELMELLI, P. et al. Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the COMFORT-II study. **Blood**, v. 123, n. 14, p. 2157-2160, 2014. ISSN 0006-4971.

GUO, J. et al. JAK2V617F drives Mcl-1 expression and sensitizes hematologic cell lines to dual inhibition of JAK2 and Bcl-xL. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0114363, 2015. ISSN 1932-6203.

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, 2012. ISSN 0028-4793.

HARRISON, C. et al. Practical management of patients with myelofibrosis receiving ruxolitinib. **Expert review of hematology**, v. 6, n. 5, p. 511-523, 2013. ISSN 1747-4086.

HO, P. et al. Practical management of myelofibrosis with ruxolitinib. **Internal medicine journal**, v. 45, n. 12, p. 1221-1230, 2015. ISSN 1445-5994.

HUSSAIN, S.-R. A. et al. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 7, p. 2144-2150, 2007. ISSN 1078-0432.

JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1144, 2005. ISSN 0028-0836.

JAMIESON, C. H. et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 16, p. 6224-6229, 2006. ISSN 0027-8424.

JOHN MASCARENHAS, V. N., MARINA KREMYANSKAYA, AND RONALD HOFFMAN. PRIMARY MYELOFIBROSIS. In: SAUNDERS, E. (Ed.). **Hematology: basic principles and practice**, v.6, 2013. cap. 69, p.1053-1076.

KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2379-2390, 2013. ISSN 0028-4793.

KLEPPE, M. et al. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. **Cancer discovery**, v. 5, n. 3, p. 316-331, 2015. ISSN 2159-8274.

KOMROKJI, R. S. et al. Advances in the management of myelofibrosis. **Cancer Control**, v. 19, n. 4, p. 210-22, 2012.

KOPPIKAR, P. et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 155, 2012.

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, 2005. ISSN 0028-4793.

KURODA, J. et al. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 40, p. 14907-14912, 2006. ISSN 0027-8424.

LAGADINO, E. D. et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. **Cell stem cell**, v. 12, n. 3, p. 329-341, 2013. ISSN 1934-5909.

LATAILLADE, J.-J. et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. **Blood**, v. 112, n. 8, p. 3026-3035, 2008. ISSN 0006-4971.

LEVINE, R. L.; GILLILAND, D. G. Myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2190-2198, 2008. ISSN 0006-4971.

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, 2005. ISSN 1535-6108.

MEYER, S. C. Mechanisms of Resistance to JAK2 Inhibitors in Myeloproliferative Neoplasms. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, 2017. ISSN 0889-8588.

MILLER, C. B. et al. Practical Measures of Clinical Benefit With Ruxolitinib Therapy: An Exploratory Analysis of COMFORT-I. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, 2017. ISSN 2152-2650.

MILOSEVIC, J. D.; KRALOVICS, R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. **International journal of hematology**, v. 97, n. 2, p. 183-197, 2013. ISSN 0925-5710.

MILYAVSKY, M. et al. A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. **Cell stem cell**, v. 7, n. 2, p. 186-197, 2010. ISSN 1934-5909.

MULLALLY, A. et al. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. **Cancer cell**, v. 17, n. 6, p. 584-596, 2010. ISSN 1535-6108.

MULLALLY, A. et al. Distinct roles for long-term hematopoietic stem cells and erythroid precursor cells in a murine model of Jak2V617F-mediated polycythemia vera. **Blood**, v. 120, n. 1, p. 166-172, 2012. ISSN 0006-4971.

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, 2013. ISSN 0028-4793.

OH, S. T. et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 988-992, 2010. ISSN 0006-4971.

OPFERMAN, J. T. et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1101-1104, 2005. ISSN 0036-8075.

PARK, J.-H. et al. Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms: comparison of three diagnostic methods. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0141010, 2015. ISSN 1932-6203.

PASSAMONTI, F. How I treat polycythemia vera. **Blood**, v. 120, n. 2, p. 275-284, 2012. ISSN 0006-4971.

PAULUS, A. et al. **Phase I/II Clinical Trial of Lenalidomide in Combination with AT101 for the Treatment of Relapsed B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL)**: Am Soc Hematology 2015.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001. ISSN 1362-4962.

PIETRA, D. et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1686-1689, 2008. ISSN 0006-4971.

PRONK, C. J.; BRYDER, D. Flow cytometry-based identification of immature myeloerythroid development. **Flow Cytometry Protocols**, p. 275-293, 2011. ISSN 1617379492.

PRONK, C. J. et al. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. **Cell stem cell**, v. 1, n. 4, p. 428-442, 2007. ISSN 1934-5909.

QUINTÁS-CARDAMA, A. et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 115, n. 15, p. 3109-3117, 2010. ISSN 0006-4971.

RONALD HOFFMAN, M. K., VESNA NAJFELD, AND JOHN MASCARENHAS. Trombocitemia Essencial. In: ELSEVIER, S. (Ed.). **Hematology: basic principles and practice**. 6, 2013. cap. 68, p.1034-1052.

RUBERT, J. et al. Bim and Mcl-1 exert key roles in regulating JAK2 V617F cell survival. **BMC cancer**, v. 11, n. 1, p. 24, 2011. ISSN 1471-2407.

RUMI, E. et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. **Blood**, v. 123, n. 10, p. 1544-1551, 2014. ISSN 0006-4971.

SCOTT, L. M. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 5, p. 459-468, 2007. ISSN 0028-4793.

SILVA, M. et al. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 9, p. 564-571, 1998. ISSN 0028-4793.

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

TEFFERI, A. Myeloproliferative neoplasms: a decade of discoveries and treatment advances. **American journal of hematology**, v. 91, n. 1, p. 50-58, 2016a. ISSN 1096-8652.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American journal of hematology**, v. 91, n. 12, p. 1262-1271, 2016b. ISSN 1096-8652.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American journal of hematology**, v. 92, n. 1, p. 94-108, 2017. ISSN 1096-8652.

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. 2507-2513, 2014. ISSN 0006-4971.

TEFFERI, A. et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. **Leukemia**, v. 28, n. 7, p. 1494, 2014. ISSN 0887-6924.

TEFFERI, A. et al. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. **Blood**, v. 124, n. 15, p. 2465-2466, 2014. ISSN 0006-4971.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Genetics: CALR mutations and a new diagnostic algorithm for MPN. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 11, n. 3, p. 125-126, 2014. ISSN 1759-4774.

TEFFERI, A. et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. **Leukemia**, v. 27, n. 9, p. 1874, 2013.

TITMARSH, G. J. et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 6, p. 581-587, 2014. ISSN 1096-8652.

TOGNON, R. et al. Deregulation of apoptosis-related genes is associated with PRV1 overexpression and JAK2 V617F allele burden in Essential Thrombocythemia and Myelofibrosis. **Journal of hematology & oncology**, v. 5, n. 1, p. 2, 2012. ISSN 1756-8722.

TRUDEL, S. et al. Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5430-5438, 2007. ISSN 0006-4971.

VANNUCCHI, A. M. How I treat polycythemia vera. **Blood**, v. 124, n. 22, p. 3212-3220, 2014. ISSN 0006-4971.

VANNUCCHI, A. M. et al. A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase 3 trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. **Haematologica**, p. haematol. 2014.119545, 2015. ISSN 0390-6078.

VANNUCCHI, A. M. et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 5, p. 426-435, 2015. ISSN 0028-4793.

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, p. 937-951, 2009. ISSN 0006-4971.

VERMES I, H. C., REUTELINGSPERGER C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000. ISSN 00221759.

VERSTOVSEK, S. et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 12, p. 1117-1127, 2010. ISSN 0028-4793.

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, 2012. ISSN 0028-4793.

VERSTOVSEK, S. et al. Three-year efficacy, overall survival, and safety of ruxolitinib therapy in patients with myelofibrosis from the COMFORT-I study. **Haematologica**, p. haematol. 2014.115840, 2015. ISSN 0390-6078.

VO, T.-T. et al. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. **Cell**, v. 151, n. 2, p. 344-355, 2012. ISSN 0092-8674.

WAIBEL, M. et al. Combined targeting of JAK2 and Bcl-2/Bcl-xL to cure mutant JAK2-driven malignancies and overcome acquired resistance to JAK2 inhibitors. **Cell reports**, v. 5, n. 4, p. 1047-1059, 2013. ISSN 2211-1247.

WILL, B. et al. Apoptosis induced by JAK2 inhibition is mediated by Bim and enhanced by the BH3 mimetic ABT-737 in JAK2 mutant human erythroid cells. **Blood**, v. 115, n. 14, p. 2901-2909, 2010. ISSN 0006-4971.

YILMAZ, Ö. H.; KIEL, M. J.; MORRISON, S. J. SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 924-930, 2006. ISSN 0006-4971.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 1, p. 47, 2008. ISSN 1471-0072.

ZEUNER, A. et al. Activity of the BH3 mimetic ABT-737 on polycythemia vera erythroid precursor cells. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1522-1525, 2009. ISSN 0006-4971.

ZHANG, L. et al. The pan-Bcl2 Inhibitor AT101 Activates the Intrinsic Apoptotic Pathway and Causes DNA Damage in Acute Myeloid Leukemia Stem-Like Cells. **Targeted Oncology**, p. 1-11, 2017. ISSN 1776-2596.

ZHAO, R. et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 22788-22792, 2005. ISSN 0021-9258.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do comitê de ética em seres humanos

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

Ribeirão Preto, 15 de outubro de 2014

Ofício nº 3841/2014
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 10073/2014

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **"IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL2 COMO ALVO TERAPÊUTICO NO TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS ASSOCIADAS A MUTAÇÃO DA JAK2V617F"** – Versão 2 de 16 de setembro de 2014, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 396ª Reunião Ordinária realizada em 13/10/2014, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 de 16 de setembro de 2014.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
LORENA LOBO DE FIGUEIREDO-PONTES
CRISTINA TAVARES LEAL (Aluna)
Depto. de Clínica Médica – Divisão de Hematologia

ANEXO B - Parecer do comitê de ética em animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 161/2014, sobre o projeto intitulado “*Identificação das proteínas da família BCL2 como alvo terapêutico no tratamento das neoplasias mieloproliferativas associadas a mutação da JAK2V617F*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Magalhães Rego** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de abril de 2015.

We certify that the protocol nº 161/2014, entitled “*Identification of the BCL2 family of proteins as a therapeutic target in the treatment of myeloproliferative neoplasms associated with the JAK2V617F mutation*”, 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 the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 04/27/2015.

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2015.

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

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido controle

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULOwww.hcrp.fmrp.usp.br **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto: “Identificação da família BCL2 de regulação da apoptose como alvo terapêutico no tratamento das neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2V617F”

*Instituição: Divisão de Hematologia / Departamento de Clínica Médica
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP*

Investigadores: Cristina Tavares Leal, Adriana Queiroz Arantes, Leonardo Carvalho Palma, Belinda Pinto Simões, Eduardo Magalhães Rego, Lorena Lobo de Figueiredo Pontes.

Através deste documento, solicitamos sua autorização para fazer parte de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o papel da desregulação de genes responsáveis pela morte celular normal na origem da sua doença (Doença Mieloproliferativa Crônica). Pesquisas realizadas anteriormente sugerem que estes genes, chamados “BCL2”, podem estar alterados neste grupo de doenças e, se isso for confirmado, podemos pensar no futuro em usar drogas que normalizem este desequilíbrio e, portanto, melhorem o tratamento dessa condição. Para comparação com as amostras de indivíduos portadores dessa doença, precisamos de amostras de medula óssea normal, motivo pelo qual estamos solicitando a sua colaboração.

Para participar do estudo, é necessário que você concorde que, após o término da infusão da sua medula óssea doada para transplante, a bolsa a ser descartada (que contém uma pequena quantidade de células residuais) e/ou o tubo de sangue da medula óssea usado para contagem do número de células sendo transplantadas, sejam utilizados para os experimentos da pesquisa ao invés de serem desprezados no lixo hospitalar. A doação deste material para a pesquisa é totalmente voluntária e não lhe oferecerá riscos adicionais ou prejuízo no seu cuidado ou transplante. Não haverá ressarcimento financeiro pois a participação não implica em nenhum procedimento ou comparecimento extra ao hospital.

As informações obtidas por este trabalho poderão auxiliar no melhor entendimento e contribuir para a descoberta de novas opções de tratamento das Doenças Mieloproliferativas crônicas. O senhor (a) não terá nenhum benefício imediato por participar do estudo e pode recusar-se a participar da pesquisa ou mesmo retirar o seu consentimento em qualquer fase da mesma, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e tratamento. Vale ressaltar ainda que os dados obtidos nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e usados apenas para este fim, e se, após a leitura destas informações, o(a) senhor(a) autorizar o seu uso, assinando este termo de consentimento.

Uma cópia do presente termo assinada por um dos investigadores será fornecida ao Senhor(a), e se houver alguma dúvida sobre a pesquisa ou sobre sua permanência na mesma, poderá entrar em contato com os investigadores pelo telefone (16) 3602-2294 ou Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228.

Após ter recebido as informações sobre a participação no estudo, concordo em ceder parte do material extra de medula óssea para a pesquisa acima.

Assinatura do participante ou responsável legal

Data

Nome do participante ou responsável legal

Assinatura do investigador

Data

Nome do investigador

ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido paciente

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

www.hcrp.fmrp.usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Identificação da família BCL2 de regulação da apoptose como alvo terapêutico no tratamento das neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da JAK2V617F”

*Instituição: Divisão de Hematologia / Departamento de Clínica Médica
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP*

Investigadores: Cristina Tavares Leal, Adriana Queiroz Arantes, Leonardo Carvalho Palma, Belinda Pinto Simões, Eduardo Magalhães Rego, Lorena Lobo de Figueiredo Pontes.

Através deste documento, solicitamos sua autorização para fazer parte de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o papel da desregulação de genes responsáveis pela morte celular normal na origem da sua doença (Doença Mieloproliferativa Crônica). Pesquisas realizadas anteriormente sugerem que estes genes, chamados “BCL2”, podem estar alterados neste grupo de doenças e, se isso for confirmado, podemos pensar no futuro em usar drogas que normalizem este desequilíbrio e, portanto, melhorem o tratamento dessa condição.

Para participar do estudo, é necessário que uma parte da amostra da sua medula óssea (810 mL), colhida para os exames necessários ao seu diagnóstico e/ou acompanhamento seja utilizada para os experimentos da pesquisa.

Esta doação é totalmente voluntária e será realizada no dia em que você for realizar o exame já indicado pelo seu médico e, portanto, não haverá ressarcimentos em relação ao seu transporte ou alimentação. O risco desta doação é mínimo e está relacionado à coleta do sangue de medula óssea já indicada pelo seu médico. O desconforto que você pode sentir é apenas da picada da agulha durante a coleta e de um potencial hematoma que pode se formar no local da picada da agulha. Infecção no local da coleta de medula óssea pode acontecer muito raramente. A equipe assistente e de pesquisa fornecerá o atendimento médico necessário caso alguma lesão ou complicação ocorra decorrente da coleta da amostra.

As informações obtidas por este trabalho poderão auxiliar no melhor entendimento e contribuir para a descoberta de novas opções de tratamento da sua doença. O senhor (a) não terá nenhum benefício imediato por participar do estudo e pode recusar-se a participar da pesquisa ou mesmo retirar o seu consentimento em qualquer fase da mesma, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e tratamento. Vale ressaltar ainda que os dados obtidos nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e usados apenas para este fim, e se, após a leitura destas informações, o(a) senhor(a) autorizar o seu uso, assinando este termo de consentimento.

Uma cópia do presente termo assinada por um dos investigadores será fornecida ao Senhor(a), e se houver alguma dúvida sobre a pesquisa ou sobre sua permanência na mesma, poderá entrar em contato com os investigadores pelo telefone (16) 3602-2294 ou Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228.

Após ter recebido as informações sobre a participação no estudo, concordo em ceder parte do material colhido para o acompanhamento laboratorial da minha doença para a pesquisa acima.

Assinatura do participante ou responsável legal

Data

Nome do participante ou responsável legal

Assinatura do investigador

Data

Nome do investigador