UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RENATA SCOPIM RIBEIRO

**Investigação do efeito da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 no
fenótipo de células leucêmicas BCR-ABL1⁺**

Ribeirão Preto
2017

RENATA SCOPIM RIBEIRO

**Investigação do efeito da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 no
fenótipo de células leucêmicas BCR-ABL1⁺**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco
e Terapia Celular.

Área de Concentração: Diferenciação Celular
Normal e Neoplásica

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Traina

**Ribeirão Preto
2017**

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

FICHA CATALOGRÁFICA
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

SCOPIIM-RIBEIRO, Renata

Investigação do efeito da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 no fenótipo de células leucêmicas BCR-ABL1⁺ - Ribeirão Preto, 2017. 124 f.: il.; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.
Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientadora: Traina, Fabíola

1. Leucemia Mieloide Crônica 2. BCR-ABL1 3. T315I
4. NT157 5. Substratos do receptor de insulina 6. IRS1

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

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

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP
(Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE) - FAPESP 2016/01639-3; setembro/2016 a agosto/2017)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP
(Bolsa de doutorado - FAPESP 2014/06037-6; março/2015 a agosto/2016)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Bolsa de Doutorado – Cota institucional/Demanda Social; agosto/2014 a fevereiro/2015)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -
Processo MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 - 460750/2014-3.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA - HCFMRP - USP).

Nome: SCOPIM-RIBEIRO, Renata

Título: Investigação do efeito da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 no fenótipo de células leucêmicas BCR-ABL1⁺

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

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a meus pais Pedro e Clarice. Ouvi de uma amiga querida que a maturidade chega quando percebemos que nossos pais são humanos e, por isso, erram. Os meus são os melhores seres humanos que conheço, mas o reconhecimento das suas fraquezas fez parte do maravilhoso processo que foi a chegada dos 30 anos. Cresci acolhida em uma filosofia amorosa e mais do que isso, me inspirei diariamente nessas duas pessoas que tanto amam a leitura crítica e o diálogo. O convívio não poderia me levar por outro caminho que não o da pesquisa científica.

Aos meus irmãos Daniela e Leonardo, o meu amor mais apaixonado. Vocês são minhas referências primeiras de amor e de amizade e eu posso dizer que sou a pessoa mais sortuda do mundo por ter amigos tão irmãos, não importa a distância.

A minha falecida avó Maria Joana, que de algum lugar me guardou nos períodos mais difíceis e nas mudanças drásticas que o doutorado me impôs, a minha mais profunda saudade.

Ao meu agora marido Ricardo. Nossas aventuras me fizeram mais forte e feliz, mas nós dois sabemos o quanto arriscamos quando decidimos dividir a solidão que é viver fora do país. Seu amor me ajudou a conquistar tantas coisas maravilhosas, e nossa vida juntos oficialmente mal começou. Obrigada por partilhar dos três anos que originaram essa tese e pela indispensável ajuda na formatação (outra vez).

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiola Traina, mais uma vez, o meu muito obrigada. Nesses oito anos eu tive a oportunidade de agradecer muitas vezes, mas não acho que palavras seriam suficientes. Sua paciência e dedicação me acompanharam desde a graduação por caminhos muito mais promissores do que eu seria capaz de imaginar. Essa jornada da qual hoje me orgulho se deve em grande parte à ela e eu sou grata por ter me aceitado como sua aluna, confiar em mim, me fazer melhor e ser suporte quando eu pensei em desistir.

Aos amigos João Agostinho Machado Neto, por ser tão indispensável e Paula de Melo Campos, pelo trabalho apresentado no ASH que me levou para Portland e mudou minha vida.

Aos amigos e alunos da pós-graduação da FMRP Fernanda Gutierrez, Jaqueline Fernandez, Juan Coelho, Diego Martins, Gustavo Borges, João Paulo da Silva, André Pinto, Bruna Fenerich, Fernanda Borges e Ana Paula Alves meu agradecimento por tornar Ribeirão Preto um lugar tão querido, apesar dos pesares. Eu realmente não teria suportado sem a amizade de vocês.

Aos docentes da pós-graduação da FMRP da USP pela organização do programa e pelas aulas. Especialmente a Profa Dra Letícia Fröhlich Archângelo, pela importante orientação durante a realização do estágio PAE e por ter me ajudado tanto durante o período de adaptação em Ribeirão Preto; obrigada por dividir o apartamento, conversar na sala sem móveis e sem ar condicionado sobre a vida e pelas inúmeras caronas de volta para Campinas.

Aos membros da banca Prof Dr Vitor Marcel Faça, Prof Dr Fernando Chahud, Prof Dr José Barreto Carvalheira e Profa Dra Kátia Borgia Barbosa Pagnano, pelo tempo dispendido e por todas as considerações. Um trabalho científico requer muito mais que uma cabeça pensante e é muito importante que pessoas de tão grande competência possam acrescentar seus diferentes pontos de vista sobre o processo e sobre os resultados.

À Adriana Maria Teles Fuzaro pelo auxílio administrativo.

A todos os pacientes do ambulatório, por fazer de um momento tão difícil e doloroso uma oportunidade para o avanço no tratamento de suas doenças. Que todas as vezes que nessa dissertação for lida a expressão “amostra de medula óssea” nos lembremos de que se trata de um procedimento doloroso e invasivo para indivíduos já fragilizados por sua condição.

Aos amigos em Portland: David Edwards por ter sido tão receptivo e gentil na minha chegada; Chris Eide, pela gentileza de me buscar no aeroporto, garantir “happy hours”, pelo interesse e respeito pelo Brasil e, principalmente, por sua competência e indispensável ajuda no desenho do meu projeto e nos experimentos realizados em Portland; Elie Traer e sua família maravilhosa por nos acolher em sua casa mesmo sem saber nossos nomes, ou mesmo que éramos dois. Por me proporcionar, através da Jakki Martinez e da Isabel English, o treinamento necessário para a realização do principal experimento do meu projeto em Portland. Pelo thanksgiving, pelo recém nascido Isaac Traer e por me oferecer a oportunidade de retribuir toda a ajuda com meu trabalho; as queridas Samantha Savage, Anna Reister e Marylinn Chow pela paciência, carinho e diversão.

À Cristina Tognon, pelo profissionalismo, atenção e cuidado durante processo de obtenção do meu visto e durante a minha mudança para Portland.

Ao Dr Brian Druker, pela história de conquistas na luta contra o câncer e por abrir tão gentilmente as portas do seu laboratório para mim.

*Hoje me sinto mais forte, mais feliz
quem sabe. Só levo a certeza de
que muito pouco eu sei.
Ou nada sei.*

Almir Sater

RESUMO

SCOPIM-RIBEIRO, R. **Investigação do efeito da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 no fenótipo de células leucêmicas BCR-ABL1⁺**. 2017, 124f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica maligna associada à atividade tirosinoquinase da oncoproteína BCR-ABL1. A maioria dos casos de LMC é tratada com sucesso com inibidores tirosinoquinase de BCR-ABL1, mas uma porcentagem significativa de pacientes desenvolve resistência ao fármaco. Estudos recentes indicam que a célula-tronco leucêmica é resistente ao tratamento com imatinibe. A identificação de outras proteínas que cooperam com as vias de sinalização BCR-ABL1 podem indicar novos alvos terapêuticos. Os substratos do receptor de insulina (IRS) têm emergido como proteínas importantes na fisiopatologia de neoplasias sólidas e hematológicas. Um inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2, NT157, foi desenvolvido e mostrou resultados promissores em estudos pré-clínicos com tumores sólidos. A associação constitutiva de IRS1 com BCR-ABL1 e o efeito antineoplásico resultante do silenciamento específico de IRS1 em células K562 BCR-ABL1⁺ suportam a hipótese deste trabalho. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 no fenótipo de células hematopoéticas leucêmicas BCR-ABL1⁺ utilizando células primárias, células K562 e modelos murinos. *IRS1*, mas não *IRS2*, apresentou-se menos expresso em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LMC quando comparadas às amostras de células hematopoéticas normais ($p < 0,0001$). NT157 reduziu a formação de colônias de células primárias de pacientes com LMC, mas não de células hematopoéticas de indivíduos saudáveis. Em células K562, o tratamento com o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2, NT157, reduziu a viabilidade e proliferação celular e induziu apoptose ($p < 0,05$), inibiu a fosforilação de IGF1R, STAT3, STAT5, 4EBP1, P70S6K e ERK1/2, aumentou a expressão dos genes supressores de tumor *CDKN1A*, *FOS* e *JUN* e reduziu a expressão dos oncogenes *MYC* e *BCL2* ($p < 0,05$); a inibição específica de IRS1 através de lentivírus, mas não de IRS2, reduziu a viabilidade celular ($p < 0,05$). Em células murinas Ba/F3 BCR-ABL1 e BCR-ABL1^{T315I}, o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2, NT157, induziu apoptose e reduziu ativação de ERK1/2 *in vitro*. Na dose de 50mg/kg/dia, NT157 intraperitoneal e/ou imatinibe por gavagem falharam em reduzir o crescimento tumoral *in vivo* em modelo de tumor

alográfico induzido por células Ba/F3 BCR-ABL1 e BCR-ABL1^{T315I}. Em modelo animal de leucemia induzido por transplante de células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1: (i) o tratamento com NT157 100mg/kg intraperitoneal, 3 vezes por semana, combinado com imatinibe 100mg/kg/dia por gavagem, reduziu significativamente o peso do baço, e preveniu a perda de peso comparado com veículo ($p<0,05$); apenas a monoterapia com imatinibe prolongou a sobrevida dos animais, (ii) o tratamento com NT157 70mg/kg intraperitoneal, 3 vezes por semana, e/ou imatinibe 70mg/kg/dia por gavagem não teve impacto no peso do baço e na variação do peso corporal; o tratamento com imatinibe em monoterapia ou combinado com NT157 prolongou a sobrevida dos animais ($p<0,05$). Em conclusão, o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2 representa uma droga potencialmente eficaz no tratamento da LMC, especialmente em casos de resistência com mutação BCR-ABL1 T315I. A avaliação da eficácia do inibidor farmacológico NT157 em modelos animais de LMC exige ajustes nos modelos murinos utilizados no presente estudo, melhor entendimento da farmacodinâmica e farmacocinética do composto e ajustes no esquema terapêutico utilizado.

Palavras-chave; Leucemia Mieloide Crônica. BCR-ABL1. T315I. NT157. Substratos do receptor de insulina. IRS1.

ABSTRACT

SCOPIM-RIBEIRO, R. **Investigation of the effects of IGF1R-IRS1/2 pharmacological inhibition on the phenotype of BCR-ABL1⁺ leukemic cells.** 2017, 124f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematological malignancy associated with the tyrosine kinase activity of the BCR-ABL1 oncoprotein. Most cases of CML are successfully treated with BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors, but a significant percentage of patients develop resistance. Recent studies indicate that leukemic stem cell is resistant to imatinib treatment. The identification of other proteins that cooperate with the BCR-ABL1 signaling pathway may indicate novel therapeutic targets. Insulin receptor substrates (IRS) have emerged as important proteins in the pathophysiology of solid and hematological neoplasms. A pharmacological inhibitor of IGF1R-IRS1/2, NT157, has been developed and shown promising results in preclinical studies with solid tumors. The constitutive association of IRS1 with BCR-ABL1, and the antineoplastic effects resulting from IRS1-specific silencing in K562 BCR-ABL1⁺ cells, support the hypothesis of this work. The aim of the present study was to investigate the effect of pharmacological inhibition of IGF1R-IRS1/2 on the phenotype of BCR-ABL1⁺ leukemia cells, using primary cells, K562 cell line and murine models. IRS1, but not IRS2, was downregulated in bone marrow samples from CML patients compared to bone marrow cells from healthy donors ($p < 0.0001$). NT157 reduced colony formation of primary cells from CML patients but not from healthy donors. In K562 cells, treatment with the pharmacological inhibitor IGF1R-IRS1/2, NT157, reduced cell viability and proliferation, induced apoptosis ($p < 0.05$), inhibited the phosphorylation of IGF1R, STAT3, STAT5, 4EBP1, P70S6K and ERK1/2, increased expression of tumor suppressor genes *CDKN1A*, *FOS* and *JUN*, and reduced expression of oncogenes *MYC* and *BCL2* ($p < 0.05$); IRS1 silencing mediated by lentivirus, but not IRS2, reduced cell viability ($p < 0.05$). In murine Ba/F3 BCR-ABL1 and Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} cells, the pharmacological inhibitor of IGF1R-IRS1/2, NT157, induced apoptosis and reduced ERK1/2 activation *in vitro*. At 50mg/kg/day, NT157 intraperitoneally and/or imatinib orally, failed to reduce tumor burden *in vivo* in an allographic tumor model induced by Ba/F3 BCR-ABL1 and Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} cells. In an animal leukemia model induced by transplantation of BCR-ABL1-transduced hematopoietic cells: (i) treatment with NT157 100mg/kg intraperitoneally, 3 times per week,

combined with imatinib 100mg/kg/day per gavage, significantly reduced spleen weight, and prevented weight loss compared to vehicle ($p<0.05$); only imatinib monotherapy prolonged survival ($p<0.05$), (ii) treatment with NT157 70 mg/kg intraperitoneally, 3 times per week, and/or imatinib 70 mg/kg/day per gavage had no impact on spleen weight and body weight; treatment with imatinib alone or combined with NT157 prolonged survival ($p<0.05$). In conclusion, the pharmacological inhibitor of IGF1R-IRS1/2 represents a potential effective drug in CML therapy, especially in cases of resistant BCR-ABL1 T315I mutation. The evaluation of the NT157 pharmacological efficacy in CML animal models requires adjustments in the murine models used in the present study, better understanding of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the compound and adjustments in the therapeutic scheme used.

Keywords; Chronic Myeloid Leukemia. BCR-ABL1. T315I. NT157. Insulin receptor substrates. IRS1.

LISTA DE ABREVIACES

AKT	<i>AKT Serine/Threonine Kinase</i> (quinase de serina e treonina AKT)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de varincia)
BCR-ABL1	<i>Breakpoint Cluster Region/ABL Proto-Oncogene 1</i> (região de agrupamento de pontos de quebra/Proto-oncogene ABL1)_
<i>cDNA</i>	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> (cido desoxirribonucleico)
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> (Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco)
<i>EDTA</i>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (cido etilenodiamino tetra-acético)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> (quinases reguladas por sinal extracelular)
FOS	Proto-Oncogene <i>Fos</i> /Subunidade do fator de transcrio AP-1
IGF1	<i>Insulin Like Growth Factor 1</i> (fator de crescimento semelhante  Insulina-1)
IGF1R	<i>Insulin Like Growth Factor 1 Receptor</i> (receptor do fator de crescimento semelhante  Insulina-1)
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i> (meio de Dulbecco modificado por Iscoe)
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i> (Substrato do receptor de insulina)
LMC	Leucemia mieloide crônica
JAK1/2	<i>Janus kinase1/2</i>
JUN	Proto-oncogene <i>JUN</i> / Subunidade do fator de transcrio AP-1
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (<i>Proteína quinase ativado por mitgeno</i>)
MPL	Proto-oncogene <i>MPL</i> , receptor de trombopoetina
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i> (<i>alvo mecanstico de Rapamicina</i>)
NMP	Neoplasia mieloproliferativa

NOD	<i>Non-obese diabetic</i> (diabético não obeso)
PI	<i>Propidium iodide</i> (iodeto de propídeo)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase)
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (meio do instituto Memorial Roswell Park)
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> (síndrome da imunodeficiência severa combinada)
SFB	Soro fetal bovino
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> (Conversor de sinal e ativador de transcrição 3)
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i> (Conversor de sinal e ativador de transcrição 5)
Ser	Aminoácido Serina
Thr	Aminoácido Treonina
x g	Unidade de força de centrifugação “vezes gravidade”
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde-OMS)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hierarquia da hematopoese humana..	22
Figura 2. Representação esquemática do rearranjo de <i>ABL1</i> e <i>BCR</i> na t(9,22)(q34;q11).....	24
Figura 3. Transdução do sinal durante ação da insulina.....	31
Figura 4. Estrutura proteica de IRS1 e IRS2.	33
Figura 5. Avaliação da expressão de GFP em células Ba/F3 parentais transduzidas com retrovírus para BCR-ABL1..	52
Figura 6. Expressão de <i>IRS1</i> , mas não de <i>IRS2</i> , é diminuída em células de medula óssea de pacientes com LMC comparadas às amostras de células hematopoéticas normais.	56
Figura 7. O tratamento com NT157 não inibe a formação de colônias de células de sangue de cordão umbilical de indivíduos saudáveis.....	57
Figura 8. O tratamento com NT157 reduz a formação de colônias de células de pacientes com LMC ao diagnóstico..	58
Figura 9. O tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular e a proliferação de células K562.	59
Figura 10. O tratamento com NT157 aumenta a apoptose em células K562.	61
Figura 11. Exposição ao composto NT157 inibe a via IGF1R-IRS1/2 e STAT3/5 em células K562.	63
Figura 12. Perfil da expressão de oncogenes, supressores de tumor e genes da via PI3K/AKT moduladas por NT157 em células K562.	65
Figura 13. Validação de resultados de PCR <i>array</i> usando PCRq.	66
Figura 14. O silenciamento de IRS1 diminui a viabilidade celular em células K562.....	67
Figura 15. O silenciamento de IRS2 aumenta a viabilidade celular em células K562.....	68
Figura 16. O tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular em células Ba/F3.	70
Figura 17. Valores de IC50 para o tratamento com NT157 em células Ba/F3.	71
Figura 18. O tratamento com NT157 aumenta a apoptose em células Ba/F3.	75
Figura 19. Análise de <i>Western blot</i> para extratos celulares totais de células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T315I}	76

Figura 20. O inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2 e/ou imatinibe não modularam o crescimento de tumor induzido por células Ba/F3 BCR-ABL1 e células Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T315I}	78
Figura 21. Representação esquemática do desenvolvimento de modelo animal de leucemia BCR-ABL1 ⁺	79
Figura 22. Tratamento com NT157 e/ou imatinibe em camundongos submetidos a transplante de células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1.	81
Figura 23. Variação do peso corporal de animais transplantados com células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1 e tratadas com veículo, NT157 e/ou imatinibe.....	82
Figura 24. Curva de sobrevida de animais transplantados com células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1 e tratados com veículo, NT157 e/ou imatinibe.....	83
Figura 25. Representação esquemática do desenvolvimento de modelo animal de leucemia BCR-ABL1 ⁺	84
Figura 26. Tratamento com NT157 em camundongos submetidos a transplante de células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1.	85
Figura 27. Variação do peso corporal de animais transplantados com células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1 e tratadas com veículo, NT157 e/ou imatinibe.....	87
Figura 28. Curva de sobrevida de animais transplantados com células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1 e tratados com veículo, NT157 e/ou imatinibe.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos pacientes com leucemia mieloide crônica	41
Tabela 2. Características das linhagens celulares	42
Tabela 3. Iniciadores utilizados nas reações de PCR quantitativo (PCRq) em tempo real.	47
Tabela 4. Anticorpos específicos contra proteínas (totais ou fosforiladas) utilizados para análise de expressão proteica por <i>Western Blot</i>	49
Tabela 5. Concentração das citocinas adicionadas ao meio para estímulo de células de medula óssea coletadas de camundongos doadores.	53
Tabela 6. Valores hematimétricos no dia da eutanásia no experimento 1.....	82
Tabela 7. Tamanho dos órgãos no dia da eutanásia no experimento 1.	83
Tabela 8. Valores hematimétricos obtidos no dia da eutanásia no experimento 2.	86
Tabela 9. Tamanho dos órgãos no dia da eutanásia no experimento 2.	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Hematopoese humana	21
1.2 Leucemia Mieloide Crônica.....	22
1.2.1 Aspectos históricos da leucemia mieloide crônica	23
1.2.2 Biologia molecular da leucemia mielide crônica	25
1.2.3 Tratamento da leucemia mieloide crônica.....	27
1.2.4 Mecanismos de resistência aos inibidores de tirosinoquinase.....	28
1.3 Proteínas IRS	30
1.3.1 IRS2 e hematopoese normal	34
1.3.2 IRS1 e hematopoese leucêmica BCR-ABL1 ⁺	35
1.4 Inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2 NT157.....	36
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo principal	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Casuística	41
3.2 Linhagens celulares.....	42
3.3 Reagentes	42
3.3.1 Meio de cultura.....	42
3.3.2 Fármacos.....	43
3.3.3 Partículas Lentivirais	43
3.4 Ensaios funcionais	43
3.4.1 Avaliação do crescimento clonal em células hematopoéticas primárias	44
3.4.2 Avaliação de viabilidade celular.....	44
3.4.3 Avaliação da proliferação celular	45
3.4.4 Avaliação da apoptose celular através da marcação com anexina V e iodeto de propídio.....	45
3.5 Ensaios moleculares.....	45
3.5.1 Extração de RNA.....	46
3.5.2 PCR quantitativo em tempo real (PCRq)	46
3.5.3 PCR array	47
3.5.4 Inibição específica de IRS1 e IRS2 mediada por lentivírus	48
3.5.5 Western Blot	48
3.6 Estabelecimento de modelos murinos de LMC BCR-ABL1 ⁺ para ensaios in vivo.....	50
3.6.1 Modelo xenográfico de tumorigênese induzida por célula Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T315I}	50
3.6.2 Modelo leucêmico BCR-ABL1 ⁺ induzido por transdução e transplante de medula óssea.....	50
3.7 Análise dos Resultados	54
4. RESULTADOS	56
4.1 Estudos utilizando células humanas primárias normais e BCR-ABL1 ⁺	56
4.1.1 Avaliação da expressão gênica de IRS1 e IRS2 em células de medula óssea de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC.....	56
4.1.2 Avaliação da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 em células hematopoéticas normais	57

4.1.3	Avaliação da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 em células hematopoéticas de pacientes com LMC ao diagnóstico.....	58
4.2	Estudos utilizando células humanas leucêmicas K562 BCR-ABL1+	59
4.2.1	A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 reduz a viabilidade e proliferação em células K562	59
4.2.2	A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 induz apoptose em células K562	60
4.2.3	O tratamento com NT157 inibe a via IGF1R-IRS1/2 e STAT3/5 em células K562	62
4.2.4	A inibição específica através de lentivírus de IRS1, mas não de IRS2, reduz a viabilidade em células K562.....	66
4.3	Estudos utilizando modelos murinos BCR-ABL1+.....	68
4.3.1	A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 reduz a viabilidade de células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T315I}	68
4.3.2	A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 aumenta a apoptose de células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T315I}	72
4.3.3	NT157 inibe a expressão de Irs1 e a ativação de Erk1/2 em células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T315I}	76
4.3.4	Avaliação do efeito do NT157 e imatinibe como monoterapia ou em combinação no crescimento de tumor induzido por em células Ba/F3 BCR-ABL1 Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T315I} in vivo	77
4.3.5	Efeito do NT157 e imatinibe como monoterapia ou em combinação em modelo animal de leucemia BCR-ABL1 ⁺	78
5.	DISCUSSÃO	89
6.	CONCLUSÕES.....	100
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
8.	ANEXOS	113
9.	APÊNDICE	125

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hematopoese humana

A hematopoese humana é um processo hierárquico responsável pela formação das células sanguíneas. Em adultos, a hematopoese ocorre a partir de uma célula tronco hematopoética (CTH) pluripotencial de longo prazo, que possui capacidade de autorrenovação e progride para CTH de curto prazo, que se diferencia nas células comprometidas com linhagens mieloide e linfoide. A divisão das CTH na medula óssea ocorre de maneira assimétrica e uma CTH dá origem a duas células filhas distintas; uma mantém a identidade de CTH e a outra se transforma em um progenitor pouco diferenciado. Esse progenitor dará origem a um precursor comum com características mieloides, que por sua vez dá origem a progenitores mais diferenciados e finalmente às células maduras da série eritrocítica, granulocítica e megacariocítica. O precursor comum com características linfoides origina os linfócitos T e B e células *natural killer*. A hematopoese depende não apenas das CTH, mas também do microambiente da medula óssea, fatores de crescimento e vias de sinalização. Os marcadores de superfície celular são responsáveis pela sinalização celular que leva à progressão do processo de diferenciação (Figura 1) [1, 2].

Figura 1. Hierarquia da hematopoese humana. A célula tronco hematopoética (CTH) reside no topo da hierarquia e é definida como a célula com capacidade de autorrenovação e potencial para dar origem a todos os tipos de células hematopoéticas (multipotente). Durante a diferenciação, a CTH perde a capacidade de autorrenovação e então se compromete com a linhagem mieloide ou linfóide, pois torna-se uma célula funcional madura. O fenótipo de cada população celular em humanos é indicado. Os precursores intermediários entre os progenitores comprometidos da primeira linhagem e células diferenciadas, assim como os diferentes subconjuntos de células B e T maduras são omitidos. PLC: progenitor linfóide comum, PMC: progenitor mieloide comum, PME: progenitor de megacariócitos/eritrócitos, PG: progenitor de granulócitos/macrófagos, PMega: progenitor de megacariócitos, PE: progenitor de eritrócitos, PG: progenitor de granulócitos, PMacro: Progenitor de macrófagos, Pré-D: Progenitor de célula dendrítica, Pré-B: Precursor de linfócitos B, Pré-T: Precursor de linfócitos T, Pré-NK: precursor de linfócitos Natural Killer, Lin: marcadores de linhagem.

1.2 Leucemia Mieloide Crônica

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia que afeta as células tronco hematopoéticas pluripotentes [3]. Nos Estados Unidos, a LMC afeta entre 1 e 2 a cada 100.000 habitantes por ano, representando entre 15 e 20% das leucemias em adultos. A média de idade dos pacientes é de 50 anos, afetando ligeiramente mais homens do que mulheres. No Brasil, foram registrados 81.001 procedimentos de quimioterapia de LMC do adulto no Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SIA-SUS) em 2012, representando prevalência anual de cerca de 10.125 casos da doença. Dados do SUS indicam que a mediana de idade da apresentação da doença no Brasil é, no mínimo, dez anos mais baixa que a encontrada na literatura internacional [4, 5].

A heterogeneidade encontrada nos exames clínicos de pacientes com LMC divide a doença em três estágios, que podem ocorrer consecutivamente ou não. A doença pode se

apresentar de maneira crônica, com as células da linhagem mieloide apresentando hipercelularidade medular com capacidade de diferenciação. Quando a doença apresenta essas características pode ser controlada com terapia medicamentosa convencional. A LMC pode se apresentar ou evoluir para a fase acelerada, em que se verifica esplenomegalia não controlada com terapia e 10-19% de blastos no sangue periférico e/ou medula óssea, $\geq 20\%$ de basófilos e persistência de trombocitose (>100.000 plaquetas/ mm^3) não controlada com terapia, ou trombocitopenia (<100.000 plaquetas/ mm^3) não relacionada à terapia. Finalmente, a LMC pode evoluir para ou se apresentar como crise blástica mieloide ou linfoide, em que as células perdem sua capacidade de diferenciação terminal ($\geq 20\%$ de blastos no sangue periférico ou medula óssea), apresentando quadro de leucemia aguda [6-8].

Os sintomas mais comuns da LMC são fadiga, anorexia, desconforto abdominal, perda de peso, sudorese e febre, embora aproximadamente 20% dos pacientes sejam assintomáticos. O diagnóstico é feito considerando os resultados do hemograma e mielograma. A confirmação da presença do gene BCR-ABL1 nas células da medula óssea pode ser feita através da análise do cariótipo, hibridização fluorescente *in situ* ou através de reação em cadeia da polimerase PCR-multiplex [4].

1.2.1 Aspectos históricos da leucemia mieloide crônica

As primeiras evidências clínicas que levaram à descoberta da LMC datam de 1840. Pacientes com quadro de esplenomegalia e alta contagem de leucócitos na França, Alemanha e Escócia eram então diagnosticados com quadro de infecção sanguínea e acreditava-se que o acúmulo de leucócitos se tratasse de secreção purulenta. Rudolph Virchow, em Berlim, usou o termo sangue branco para descrever o achado e, posteriormente, atribuiu o termo *Leukamie* à doença, afirmando que a causa poderia ser uma alteração na hematopoese [9]. Em 1872, Ernest Neumann, ao analisar a medula óssea durante a autópsia de pacientes com leucemia, verificou a presença de coloração verde amarelada diferente do vermelho usual e sugeriu que a doença teria sua origem na medula óssea [10].

Após cerca de 100 anos, um cromossomo anormal nas células do sangue de pacientes com leucemia granulocítica crônica foi identificado [3]. O cromossomo, que por seu tamanho reduzido poderia ser confundido com o cromossomo Y, foi confirmado como uma anormalidade citogenética e passou a ser chamado cromossomo Philadelphia (Ph), em referência ao local onde foi descoberto. Os avanços ocorridos na biologia molecular após a descoberta dessa alteração citogenética levaram médicos e pesquisadores a equivocadamente

acreditar que a leucemia fosse causada por infecções virais. Em 1970, Herbert Abelson e David Baltimore isolaram um gene transformador a partir de uma variante do vírus Moloney da leucemia murina [11]. O gene humano homólogo a esse transformador foi descrito na década de 1980 e ficou conhecido como gene Abelson ou *ABL1* [12]. Com o avanço das técnicas citogenéticas de bandeamento de cromossomos, o cromossomo Ph foi caracterizado por Rowley em 1973 como uma versão truncada do cromossomo 22, resultado da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 [13]. Foi verificado então que o gene *ABL1*, localizado no cromossomo 9, é translocado para o cromossomo 22 na LMC, sofrendo uma quebra no seu primeiro éxon. No cromossomo 22, a região conhecida como *breakpoint cluster region* pode sofrer quebras em diferentes posições [14]. Essa região foi posteriormente identificada como parte integrante do gene que só então ficou conhecido como BCR [15] (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do rearranjo de *ABL1* e *BCR* na *t(9,22)(q34;q11)*. Os éxons são representados pelas cores cinza e rosa claros e os íntrons são representados pelas cores cinza e rosa escuros nos genes *ABL1* e *BCR*, respectivamente. Os pontos de rearranjo são representados pelas setas vermelhas. A figura do meio indica os fragmentos que dão origem à isoforma b2a2, cujo peso molecular é de 210 kDa (p210), verificada na maioria dos casos de leucemia mielode crônica (LMC). O ponto de quebra ocorre entre os éxons 12-16 do gene *BCR*, originalmente conhecidos com b1-b5. Devido à ocorrência de *splicing* alternativo, os transcritos fusionados com as junções b2a2 e b3a2 também podem ser formados. Os rearranjos originados a partir dos outros pontos de quebra e1a2 e e19a2 originam proteínas de peso molecular 190 e 230 kDa, respectivamente (p190 e p230).

A identificação da expressão de uma proteína ABL1 de tamanho anormal e atividade enzimática aumentada em linhagem celular K562, derivada de um paciente com LMC durante transformação blástica, indicaram a ativação constitutiva da atividade tirosinoquinase de ABL1 quando fusionada ao BCR [16, 17]. Em 1990, Daley e colaboradores demonstraram a capacidade oncogênica da oncoproteína BCR-ABL1 ao verificarem que a transdução do gene BCR-ABL1, por retrovírus, em células tronco de camundongos induziu neoplasia semelhante

à fase crônica da LMC [18]. Estudos posteriores verificaram que camundongos transgênicos carregando BCR-ABL1 apresentaram maior propensão ao desenvolvimento de neoplasia [19-21].

1.2.2 Biologia molecular da leucemia mieloide crônica

O gene *ABL1*, homólogo humano do oncogene v-abl presente no vírus Abelson da leucemia murina, codifica uma tirosinoquinase não receptora. A proteína é expressa de maneira ubíqua e possui 145kDa, podendo apresentar isoformas devido ao *splicing* alternativo do primeiro éxon, e apresenta três domínios de homologia SRC (SH1-SH3) localizados na porção N-terminal. A atividade de tirosinoquinase é exercida pelo domínio SH1, enquanto os domínios SH2 e SH3 permitem a associação com outras proteínas. Sequências ricas em prolina no centro da molécula interagem com domínios SH3 de outras proteínas, como CRKL. Sinais de localização nuclear, de ligação ao DNA e domínios de ligação à actina são encontrados na porção C-terminal [22]. Camundongos nocaute para o *Abl1* apresentam reduzida viabilidade neonatal e linfopenia [23] e a sua superexpressão interrompe o ciclo celular, induzindo transformação por tirosinoquinases, proteínas G e fatores de transcrição de oncogenes, similarmente à ação dos supressores tumorais p53 e Rb [24].

A proteína BCR possui 160 kDa e também é expressa de maneira ubíqua. O primeiro éxon na porção N-terminal codifica uma quinase de serina e treonina. Seus únicos substratos identificados até o momento são a proteína associada ao BCR1 (Bap-1) e o próprio BCR. Um domínio de cauda enrolada na porção N-terminal do BCR permite a formação de dímeros *in vivo*. O domínio contendo homologia a plectrina (PH) estimula a troca do trifosfato de guanidina (GTP) por difosfato de guanidina (GDP) nos fatores de troca de guanidina Rho, que ativam fatores de transcrição com NF- κ B [25]. A proteína BCR possui diversos sítios de fosforilação em tirosina [26]. O sítio tirosina 177, por exemplo, liga-se à proteína adaptadora GBR2, importante intermediário na ativação da via de sinalização RAS. Notavelmente, *Abl1* é capaz de fosforilar Bcr em células COS1, resultando em redução da atividade de Bcr [27, 28].

Sabe-se que a fusão da extremidade 5' do BCR ao domínio SH3 do ABL1 anula a supressão fisiológica da atividade de tirosinoquinase como consequência da homodimerização e que a atividade de tirosinoquinase desregulada é fator comum das NMP [29]. A oncoproteína BCR-ABL1 possui diversos substratos, incluindo ela mesma. A autofosforilação

do BCR-ABL1 cria sítios de ligação para domínios SH2 de outras proteínas, potencializando seu efeito transformador.

A apoptose é morte celular programada caracterizada por degradação do DNA, condensação de cromatina e fragmentação nuclear [30] e é um mecanismo regulador chave para manutenção da homeostase em organismos multicelulares. Apoptose pode ser induzida por múltiplos estímulos, incluindo fatores de crescimento, privação de soro e danos ao DNA, e é regulado por diversas vias de sinalização intracelular que podem convergir [31-33]. Perturbação das vias apoptóticas em células tumorais pode conferir vantagem seletiva [30] e é sabido que o oncogene BCR-ABL1 é capaz de inibir a apoptose [34-36]. A desregulação da apoptose é importante na iniciação e progressão de muitos tipos de neoplasias [30, 37-39] e a progressão clínica da LMC sugere que os sinais iniciados por BCR-ABL1 podem afetar vias de apoptose, diferenciação e proliferação [40]. BCR-ABL1 bloqueia a apoptose em resposta à remoção de citocinas em linhagem celular Ba/F3 dependente de interleucina 3 (IL-3) [41]. As células K562 que expressam BCR-ABL1 p210 são resistentes a apoptose induzida por actinomicina D, camptotecina, etoposídeo, cicloheximida ou privação de soro, mas a expressão de sequência antisense de BCR-ABL1 inibe a resistência à apoptose de células K562 [42]. Muitas proteínas importantes em vias de sinalização de proliferação interagem com vias pró-apoptóticas. O proto-oncogene MYC é crítico para a progressão do ciclo celular e contribui para a transformação em alguns contextos celulares [43], mas também induz apoptose quando expresso de maneira desregulada [44-46]. Os mecanismos pelos quais BCR-ABL1 interage com vias de apoptose, diferenciação e proliferação precisam ser melhor esclarecidos. BCR-ABL1 contém muitos domínios estruturais e pode ativar múltiplas cascatas de sinalização. A relação entre a ativação de BCR-ABL1, p21 e RAS foi identificada [35, 47]. O domínio Src homologia 2 (SH2) do GRB2 liga-se a uma tirosina autofosforilada na posição 177 na região BCR da molécula. A mutação deste sítio de fosforilação para fenilalanina inibe a ligação de GRB2, bloqueia a ativação de RAS e prejudica gravemente a atividade transformadora em fibroblastos RAT1 [35, 48]. A importância da via de sinalização dependente de RAS para a atividade antiapoptótica do BCR-ABL1 ainda não foi estabelecida. A translocação t(9;22)(q34;q11.2) é verificada em 90–95% dos casos de LMC [49] e em aproximadamente 20% dos casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) [50]. O cromossomo Ph é raramente verificado em leucemia mieloide aguda (LMA), representando aproximadamente 1-2% dos casos de síndrome mielodisplásica Ph positivas e LMA [51].

1.2.3 Tratamento da leucemia mieloide crônica

Durante muitos anos, o tratamento da LMC foi realizado com uso de hidroxiureia ou interferon-alfa, sem mudança significativa na história natural da doença. A partir de 1975, o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico surgiu como terapia curativa para a LMC [52], mas apenas 20% dos pacientes são elegíveis para o TCTH ao diagnóstico, seja por falta de doadores compatíveis ou por condições clínicas impeditivas. Em 1996, o composto CGP 57148, da classe 2-fenilaminopirimidina, foi desenvolvido pelo médico e pesquisador Brian Druker em colaboração com a indústria farmacêutica suíça Ciba-Geigy, que, após se fundir com a também suíça Sandoz, passou a chamar-se Novartis. O CGP 57148 mimetiza a estrutura de ligação à quinase presente na molécula adenosina trifosfato (ATP), agindo como inibidor competitivo. A tirosinoquinase ABL1 associada ao ATP, ao ligar-se ao substrato proteico, resulta na adição de um grupamento fosfato ao resíduo de tirosina do substrato, que é ativado e pode então associar-se à sua proteína efetora. O efeito do composto CGP 57148 foi avaliado em diferentes quinases, mostrando-se seletivamente eficaz como inibidor competitivo da atividade tirosinoquinase ABL1, sem efeito na expressão proteica de ABL1 ou BCR-ABL1. Esse inibidor seletivo reduziu a viabilidade das linhagens celulares MO7e e 32Dcl3 expressando BCR-ABL1 (p210) na presença ou ausência de fator de crescimento, inibiu a formação de tumor induzido em 32Dcl3 e reduziu a formação de colônias a partir de células de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com LMC BCR-ABL1 positiva, mas não em amostra de medula óssea de indivíduos saudáveis ou de paciente com LMC BCR-ABL1 negativa [53].

Em estudo clínico de fase 1, o composto CGP 57148, que passou a se chamar STI571, foi bem tolerado e mostrou-se eficaz contra a LMC, induzindo resposta hematológica (parâmetros hematológicos no sangue periférico dentro dos valores de referência, associado a menos de 5% de blastos na medula óssea) e citogenética (ausência da t(9;22)(q34;q11)). No estudo fase 1, foram incluídos 83 pacientes que não toleraram ou que não obtiveram resposta ao tratamento com interferon-alfa [54]. O estudo clínico de fase 2 do STI571 revelou que o composto induziu resposta hematológica completa em 95% e resposta citogenética parcial em 60% dos 454 pacientes em fase crônica incluídos no estudo. Após 18 meses de acompanhamento, apenas 5% dos indivíduos morreram e a LMC progrediu para fase acelerada ou crise blástica em 11% dos pacientes envolvidos. Efeitos adversos grau 3 ou 4 foram raros e a toxicidade hematológica foi manejável, sendo que apenas 2% dos pacientes descontinuaram tratamento devido a eventos adversos relacionados à droga [55]. Após 10

anos de acompanhamento, os pacientes tratados com o STI571, mais recentemente denominado mesilato de imatinibe (Glivec; Novartis), como primeira linha de tratamento apresentaram sobrevida global de 83% [56].

O imatinibe tornou-se disponível no Brasil em 2000. A recomendação inicial era para pacientes refratários ou intolerantes ao interferon-alfa, sendo posteriormente considerado medicamento de primeira linha; isto é, aquele aprovado e indicado como a primeira opção no tratamento para a doença. Atualmente, o medicamento genérico é disponibilizado a pacientes do SUS e o tratamento resulta em aproximadamente 90% de sobrevida global em 5 anos [57, 58]. As medicações dasatinibe (Sprycell; Bristol-Myers Squibb) e nilotinibe (Tasigna; Novartis) são disponibilizadas em segunda linha no Brasil. A introdução dos inibidores de tirosinoquinase melhorou a qualidade de vida dos pacientes brasileiros com boa adesão ao tratamento e acompanhados com exames citogenéticos e moleculares regulares [59].

1.2.4 Mecanismos de resistência aos inibidores de tirosinoquinase

Apesar do tratamento com imatinibe induzir remissão hematológica, citogenética e molecular, e prolongar a sobrevida [56], a persistência da célula leucêmica é detectável em uma pequena porcentagem de pacientes [60]. Adicionalmente, 20-30% desses pacientes adquirem resistência ao tratamento com imatinibe [61]. A resistência ao tratamento pode ser definida como primária, quando o paciente não atinge nenhuma resposta ao uso do medicamento, ou adquirida, quando o paciente perde a resposta hematológica, citogenética ou molecular após certo tempo [62]. A resistência ao imatinibe pode ocorrer através de mecanismos celulares, como redução da biodisponibilidade oral, associação às proteínas do plasma, efluxo da droga e persistência da célula tronco leucêmica quiescente; ou mecanismos moleculares, como evolução clonal, aumento da expressão de BCR-ABL1 ou mutações no domínio tirosinoquinase do BCR-ABL1 [62], conforme detalhado a seguir.

Biodisponibilidade: a absorção gastrointestinal e disponibilização do imatinibe após metabolização no fígado varia entre pacientes e a interação de imatinibe com outras drogas também reduz sua biodisponibilidade [63]. O mesilato de imatinibe é neutralizado pela isoenzima 4A do citocromo p450 e a concentração dessa enzima varia na população [64].

Efluxo ou bloqueio do influxo da droga: a alta expressão da ATPase transmembranar transportadora de cassete de ligação ao ATP *BI* (ABCB1) aparentemente confere resistência a diversos quimioterápicos por induzir o transporte ativo (com gasto de energia e contrário ao gradiente de concentração) da droga. Imatinibe também é substrato do transportador de

cátions orgânico humano 1 (hOCT1) e sua análise sugere que o balanço entre a expressão dos transportadores de efluxo ABCB1 e influxo hOCT1 deve determinar os níveis intracelulares da droga e a resposta ao imatinibe [65].

Células tronco quiescentes: A maioria dos pacientes com LMC continuam a apresentar valores detectáveis de BCR-ABL1 através de PCRq e a recorrência da doença após descontinuação do tratamento é comum até nos pacientes cujo gene de fusão não é detectável por PCRq [66-68]. A quiescência da célula tronco leucêmica tem sido proposta como potencial mecanismo pelo qual a célula leucêmica primitiva escapa dos efeitos citotóxicos do imatinibe, mas ainda não se sabe como a atividade do BCR-ABL1 medeia a sobrevivência dessas células. Estudo recente observou, em pacientes com LMC ao diagnóstico, que células-tronco (Lin-CD34+) BCR-ABL1 positivas que não estão em divisão sobrevivem ao imatinibe em cultura *ex vivo* [69, 70]. Utilizando os marcadores de proliferação Ki-67 e PCNA, Corbin e colaboradores observaram que o imatinibe exerce seu efeito sobre o BCR-ABL1 de maneira semelhante na população quiescente e nas células em divisão celular [69]. Estes dados indicam que a resistência ao imatinibe verificada nas células quiescentes não depende da atividade do BCR-ABL1, o que exige o desenvolvimento de terapia com alvo em vias de sinalização diferentes e específicas da CTH, em combinação com uso do imatinibe.

Expressão do BCR-ABL1: apesar de pouco comum na prática clínica, o aumento da expressão do BCR-ABL1 representa a causa mais frequente de aquisição de resistência ao imatinibe em linhagens celulares. Aparentemente, o aumento da expressão do BCR-ABL1 é nocivo para as células, que diminuem viabilidade e proliferação após descontinuação do tratamento [71, 72].

Evolução clonal: a evolução da LMC tem sido associada à aquisição de anormalidades cromossômicas adicionais nas células que possuem o cromossomo Ph. A evolução clonal se associa a diminuição da resposta ao imatinibe e sobrevida global [73-76]. Estudo incluindo 171 pacientes em todas as fases da LMC verificou evolução clonal em 22% dos pacientes no momento da falha ao tratamento [77].

Mutações no domínio quinase do ABL1: A resistência ao tratamento com imatinibe devido à presença de mutações no BCR-ABL1 tem sido amplamente investigada e mais de 55 resíduos que conferem diferentes níveis de resistência foram identificados [62], levando ao desenvolvimento de novas terapias com inibidores de tirosinoquinasas mais potentes, como nilotinibe [78], dasatinibe [79, 80], ponatinibe [81] e bosutinibe [82]. Apesar do efeito potencializado e direcionado às variantes do BCR-ABL1, os tratamentos de segunda ou terceira linha apresentam níveis de toxicidade elevados [81, 82]. A mutação do domínio de

quinase T315I, que confere resistência aos tratamentos tanto de primeira como de segunda linha, foi reportada em 2001 em um caso de leucemia BCR-ABL1+ transformada após tratamento com imatinibe [83, 84]. A mutação, que também é chamada "*gatekeeper*" ou protetora, resulta na troca da treonina (Thr) presente no resíduo 315 do BCR-ABL1 selvagem por uma isoleucina (Ile). Para que os inibidores de tirosinoquinase se liguem ao sítio de ligação ao ATP, é necessária a formação de uma ponte de hidrogênio com a hidroxila do grupo radical da T315 [78, 85, 86]. A troca de Thr para Isl impede a formação da ponte de hidrogênio, criando um obstáculo espacial entre o resíduo hidrofóbico de Isl e o inibidor tirosinoquinase. A incidência da mutação T315I aumenta paralelamente com a progressão da doença, e a sobrevida dos pacientes depende da fase da doença em que a mutação é detectada: 22, 28 e 4 meses em pacientes em fase crônica, fase acelerada e crise blástica, respectivamente [87]. Pacientes com mutação T315I são resistentes aos inibidores tirosinoquinase de primeira (imatinibe) e segunda geração (dasatinibe, nilotinibe e bosutinibe) e são parcialmente sensíveis aos inibidores tirosinoquinase de terceira geração (ponatinibe) [88].

Diferentes estratégias têm sido implementadas para os pacientes resistentes, incluindo a síntese de novos inibidores ATP-competitivos ou não-ATP-competitivos de BCR-ABL1 e inibidores tirosinoquinase multialvos [89]. Uma abordagem alternativa é o uso de compostos que não se ligam diretamente à proteína BCR-ABL1. Estas moléculas atuam sobre outras proteínas que participariam da via de sinalização BCR-ABL1 e do processo de transformação maligna das células.

1.3 Proteínas IRS

Os substratos do receptor de insulina (IRS) são uma família de proteínas adaptadoras citoplasmáticas identificadas inicialmente por seu papel na sinalização da insulina [90-92] (Figura 3).

Figura 3. Transdução do sinal durante ação da insulina. O receptor de insulina é uma tirosinoquinase que sofre autofosforilação e catalisa a fosforilação de outras proteínas celulares como a família IRS, SHC e CBL. Após sua fosforilação em tirosina, as proteínas IRS interagem com moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, desencadeando ativação de vias de sinalização intracelular, incluindo a ativação de PI3K/AKT/mTOR, MAPK. Essas vias atuam de maneira coordenada na regulação do tráfico de vesículas, síntese proteica, ativação enzimática e regulação da expressão gênica, níveis de glicose e lipídios e do metabolismo proteico.

O IRS foi identificado através da imunoprecipitação com o anticorpo anti-fosfotirosina (α PY) como sendo uma proteína de 185kDa (pp185) fosforilada em tirosina em linhagem celular derivada de fígado de ratos (Fao) estimulada com insulina [93]. Outras isoformas do IRS foram posteriormente identificadas usando cromatografia por afinidade em quase todos os tecidos e células, com pesos moleculares variando de 60 a 185kDa [91, 94]. A primeira das isoformas do IRS a ser purificada foi então denominada IRS1 [91, 95]. A imunoprecipitação usando um anticorpo específico contra IRS1 revelou outra proteína fosforilada em tirosina (pp185^{HMW}) com peso molecular ligeiramente maior do que IRS1 em células Fao estimuladas com insulina [96] e em linhagens celulares progenitoras da série mieloide FDC-P1 e FDC-P2, indicando a presença de uma isoforma de IRS1, inicialmente denominada 4PS (IL-4-induced phosphotyrosine substrate) [97, 98]. A proteína 4PS foi posteriormente purificada em células FDC-P2 estimuladas com insulina usando uma proteína de fusão GST contendo o domínio

nSH2 da subunidade p85 da PI3K. O cDNA que codifica 4PS foi posteriormente clonado utilizando uma biblioteca de cDNA de camundongos e, por exibir semelhanças estruturais e funcionais com IRS1, a proteína foi então denominada IRS2 [99, 100]. Pouco depois, o gene IRS1 foi mapeado no cromossomo 1 em camundongos e no cromossomo 2q36-37 humano, enquanto o gene IRS2 foi mapeado no braço curto do cromossomo 8 em camundongos (próximo ao gene codificador do receptor de insulina) e no cromossomo 13q34 humano [100, 101]. Diversas isoformas de IRS foram posteriormente identificadas, incluindo IRS3 (pp60) [102, 103] e IRS4 (pp160) [104].

Além das proteínas IRS, foram descritas diversas outras proteínas relacionadas a IRS com menor especificidade à tirosinoquinase do receptor de insulina. Gab1 (*Grb2-associated binder-1*) é uma proteína adaptadora que compartilha homologia dos aminoácidos e várias características estruturais com IRS1, e serve como substrato tanto para o receptor EGF quanto para o IR [105]. Outros substratos da tirosinoquinase do receptor de insulina incluem proteínas que participam significativamente nas vias de sinalização de outros fatores de crescimento que não a insulina como APS (proteína adaptadora contendo o domínio PH e SH2) [106], SHC [107, 108], CBL [109] e STAT5 [110].

As proteínas IRS não possuem atividade enzimática intrínseca e contribuem para a sinalização através de suas funções como adaptadoras. Ambas compartilham homologia na porção N-terminal, em que dois domínios altamente conservados contribuem para o recrutamento do IRS até seus receptores: o domínio pleckstrin (*pleckstrin homology* – PH domain) [111] e o domínio de ligação à fosfotirosina (*phosphotyrosine binding* – PTB domain) [112] (Figura 4). A associação das proteínas IRS com seus receptores resulta na fosforilação do IRS em seus resíduos de tirosina na porção C-terminal, gerando sítios de ligação que recrutam proteínas efetoras que participam da sinalização celular das vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK [92, 99, 113].

As proteínas IRS possuem aproximadamente 20 potenciais sítios de fosforilação em resíduos de tirosina e a maioria é conservada entre IRS1 e IRS2. Os sítios de fosforilação em tirosina de IRS1 460, 608, 628, 895, 939, 985, 1172 e 1222 foram confirmados *in vitro* e *in vivo* como tendo fosforilação mediada por IR [113]. A fosforilação de IRS em resíduos de serina/treonina parece funcionar como mecanismo de regulação negativa da sinalização da insulina. IRS1 e IRS2 possuem cerca de 50 sítios de fosforilação em resíduos de serina/treonina que apresentam altos níveis basais de fosforilação. Esses níveis aumentam após estímulo por insulina [95]. O resíduo serina³⁰⁷ foi inicialmente descrito como sítio de fosforilação mediada por JNK em células tratadas com TNF- α [114]. A mutação que altera

serina³⁰⁷ para alanina elimina a fosforilação de IRS1 por JNK, anula o efeito inibitório do TNF- α na sinalização da insulina e protege animais nocaute para Jnk da resistência a insulina induzida por dieta rica em ácidos graxos [115]. O aumento na fosforilação de IRS1 em serina³⁰⁷ pode ser verificado na resistência à insulina induzida por outros fatores, como insulina/IGF1, ácidos graxos livres, aminoácidos e diversos sinais de estresse celular [116-121].

Figura 4. Estrutura proteica de IRS1 e IRS2. Os domínios PH e PTB são conservados entre IRS1 e IRS2. O domínio KRLP é encontrado somente no IRS2 e é capaz de interagir com o domínio catalítico de IR. O painel inferior esquematiza a regulação da ativação de PI3K/AKT/mTOR por IRS. Quinase de serina e treonina, em resposta a sinais extracelulares, fosforila proteínas IRS em resíduos de serina (PS), levando à inibição da ativação de PI3K/AKT/mTOR. Fosfatase de serina remove o grupamento fosfato do resíduo de serina. As proteínas IRS são fosforiladas em tirosina (PY) em resposta à ligação da insulina ao seu receptor de membrana IR, e ativam a via PI3K/AKT/mTOR.

Apesar dos esforços crescentes para elucidação dos mecanismos celulares envolvidos no aparecimento das neoplasias, a participação das proteínas IRS na ativação das vias de sinalização na hematopoese normal e leucêmica precisa ser mais bem investigada.

1.3.1 IRS2 e hematopoese normal

Sabe-se que IRS2 é ativado a partir da sua associação com receptores de três fatores de crescimento importantes para a hematopoese: receptor de eritropoetina (EPOR), trombopoetina (MPL) e IGF1 (IGF1R) [122-124]. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa identificou que a expressão de IRS2 é significativamente reduzida em amostras de medula óssea de pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) comparados a indivíduos saudáveis [125]. A participação de IRS2 na diferenciação eritroide de células hematopoéticas normais e mielodisplásicas foi evidenciada através da avaliação da expressão de IRS2 durante a diferenciação eritroide de células CD34+ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com SMD. O estudo evidenciou o aumento da expressão de IRS2 durante a diferenciação eritroide, mas o aumento na expressão de IRS2 foi menor na SMD, sugerindo um papel de IRS2 na eritropoese ineficaz da SMD. Em modelos de linhagem celular, observamos o aumento da expressão gênica, proteica e da fosforilação de IRS2 durante a diferenciação eritrocítica, granulocítica e megacariocítica [125]. Estes dados sugerem que o IRS2 é recrutado durante o processo de diferenciação das três linhagens hematopoéticas. Entretanto, a eficiência da diferenciação celular em células submetidas ao silenciamento do IRS2 ainda não foi estudada.

Em um estudo em NMP BCR-ABL1 negativas, nosso grupo identificou que IRS2 se associa a JAK^{V617F} em pacientes com NMP e contribui para o aumento da viabilidade celular e redução da apoptose em células com mutação em JAK2 [126]. A análise de sequenciamento em larga escala (*deep sequencing*) realizada por Savage e colaboradores identificou mutação em IRS2 em 13,6% (3/22) dos pacientes com LMC resistentes ao imatinibe. Em contraste, a avaliação de pacientes com NMP BCR-ABL1 negativos (n=56) revelou ocorrência de mutação em frequência significativamente inferior (5,4%), enquanto em pacientes com LMA (n=145) e LLA (n=83), não foram detectadas mutações em IRS2. A expressão das duas formas variantes de IRS2 identificadas nos pacientes com LMC (S594W e H1328R) na linhagem celular dependente de IL-3 Ba/F3 resultou em aquisição de capacidade de sobrevivência na ausência de IL-3. Quando coexpressa com BCR-ABL1 em Ba/F3, a mutação em IRS2 conferiu níveis variáveis de resistência ao imatinibe *in vitro* e persistência da fosforilação de AKT apesar da inibição da atividade de tirosinoquinase de BCR-ABL1 pelo imatinibe. Células NIH3T3 com mutação em IRS2 apresentaram sensibilidade a inibidores das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR [127].

O IGF1 é um fator de crescimento que também atua na regulação da hematopoese. O receptor do IGF1 (IGF1R) é um receptor de proteínas tirosinoquinase tipo II e possui aproximadamente 70% de homologia com o receptor de insulina (IR) [128]. A atividade tirosinoquinase do IGF1R é induzida pela sua ligação com o IGF1, permitindo a ligação do receptor com substratos que contenham domínios SH2 ou PTB, incluindo o IRS1 e IRS2, e consequente ativação da via PI3K/AKT/mTOR [129]. O IGF1 participa da eritropoese, granulopoese e linfopoese normal e neoplásica [130]. O uso de IGF1 recombinante aumentou a proliferação de células CD34+ *in vitro* [131]. Ativação do IGF1/IGF1R foi observada em LMA e leucemia linfóide crônica (LLC) [132, 133]. A diferenciação granulocítica de células HL60 induzidas com IGF1 resultou em um aumento da expressão de IRS2 e ativação da PI3K, independente do IRS1 [124].

A trombopoietina (TPO) é uma citocina endógena que promove o crescimento da CTH e é o principal regulador endógeno da produção de plaquetas. A TPO se liga ao seu receptor MPL, presente em megacariócitos e CTH [134]. Diversas evidências da ampla participação da TPO na hematopoese foram observadas: (1) ensaios de repopulação hematopoética em camundongos confirmam a participação da TPO na sobrevivência, autorrenovação e proliferação das CTH [135, 136]; (2) a sinalização de TPO/MPL em humanos participa na regulação da quiescência de CTH [137]; (3) mutação em homozigose no gene MPL humano leva a trombocitopenia amegacariocítica congênita, uma doença caracterizada por trombocitopenia severa que se manifesta logo após o nascimento. Pacientes com trombocitopenia amegacariocítica congênita apresentam grande redução ou ausência de megacariócitos na medula óssea e alto risco de evolução para anemia aplástica [138]; (4) O modelo murino nocaute para Mpl (-/-) apresentou redução nas CTH e células progenitoras [139]; (5) uma mutação *nonsense* no gene *MPL* foi associada à anemia aplástica familiar [140]. A associação de Irs2 com Mpl induzida por TPO foi observada por Miyakawa e colaboradores, que verificaram que TPO ativa a via da Pi3k em células Ba/F3/Mpl através de um complexo composto pela subunidade p85 da Pi3k, Shp2 fosforilado e Gab2 ou pela subunidade p85 da Pi3k e Irs2 [123].

1.3.2 IRS1 e hematopoese leucêmica BCR-ABL1⁺

O IRS1 é sabidamente ativado pelo IR, IGF1, VEGF, GH [141-143]. Correlação negativa da expressão de IRS1 com a sobrevida global, independente da idade e contagem de leucócitos no momento do diagnóstico, foram observadas em pacientes com LLA BCR-

ABL1+, e a análise computacional de dados obtidos de *array* sugeriu um efeito antiapoptótico de IRS1 através da regulação positiva de BCL2 e regulação negativa de FasL [144]. Nosso grupo de pesquisa identificou a associação constitutiva de IRS1 e BCR-ABL1 em células K562 e ativação da via PI3K/AKT/mTOR e MAPK induzida por esta associação proteica [145]. A participação funcional de IRS1 na via de sinalização BCR-ABL1 foi posteriormente comprovada através da observação de que o silenciamento de IRS1 por shRNA lentiviral nas células K562 resultou em redução da proliferação celular e formação de colônias, e diminuição da fosforilação de AKT, P70S6K e ERK1/2 [145, 146].

A capacidade transformadora de IRS1 foi inicialmente demonstrada em fibroblasto embrionário murino [147], células hematopoéticas murinas 32D [148] e células murinas NIH3T3 [149]. A participação de IRS1 em neoplasias sólidas humanas foi descrita inicialmente por Chang e colaboradores [150]; a análise de 34 tumores originados de 7 tecidos diferentes mostrou ativação constitutiva de IRS1 em 27 dos 34 casos (7 de 7 cânceres de mama, 5 de 7 leiomiomas, 4 de 4 tumores de Wilm's, 2 de 3 rabdomiosarcomas, 4 de 5 liposarcomas, 2 de 4 leiomiosarcomas e 3 de 4 carcinomas adrenocorticais). O potencial oncogênico da ativação de IRS1 foi confirmado através da inibição do crescimento das células cancerosas através da expressão de IRS1 dominante-negativo em câncer de mama [150].

1.4 Inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2 NT157

Em neoplasias sólidas, NT157 foi recentemente identificado como um composto específico e capaz de inibir o IGF1R, IRS1 e IRS2 [151]. Reuveni e colaboradores demonstraram que o NT157 exerce atividade de inibição de IGF1R de maneira ATP não competitiva e substrato não competitiva, sem inibir o domínio de quinase do receptor ou reduzir os níveis do RNAm de IRS1 e IRS2. De acordo com o mecanismo de ação inicialmente proposto, NT157 induz a fosforilação do IRS1/2 em serina mediada por ERK1/2 [151]. A fosforilação do sítio inibitório resulta na degradação proteica de IRS1 e IRS2. Utilizando modelos de linhagens de melanoma, o mesmo estudo verificou que o tratamento com NT157 leva a inibição da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, redução da proliferação celular e aumento da apoptose. O tratamento com NT157 também é capaz de reverter o aumento da expressão de IRS1 e IRS2 verificado em células resistentes ao tratamento com inibidor de BRAF^{V600E/K} [151]. Sanchez-Lopez e colaboradores verificaram que, em câncer de cólon, NT157 reduz o crescimento tumoral através da inibição da ativação de fibroblastos associados ao câncer, reduz a inflamação, inibe a expressão de IL-6, IL-11 e IL-23 assim

como de CCL2, CCL5, CXCL7, CXCL5, ICAM1 e TGF β . O tratamento com NT157 também reduziu proliferação e a atividade migratória das células cancerosas no fígado [152]. A superexpressão de IRS1 em linhagem celular de osteosarcoma (OS) aumentou a proliferação, migração e metástase *in vivo* e *in vitro*. O tratamento com NT157 nessas células foi efetivo e sinérgico ao uso de everolimus e NVP-BEZ235 [153]. Posteriormente, foi demonstrado que NT157 tem como alvo não somente IGF1R-IRS1/2, mas também a via de sinalização de STAT3, demonstrando exercer efeito anti-câncer em linhagem celular A375 e em modelo animal metastático de melanoma [154].

Estes dados suportam novos estudos com o objetivo de investigar a consequência fenotípica do uso de inibidores específicos de IRS1 em linhagens celulares BCR-ABL1 positivas e, principalmente, o estudo do silenciamento ou inibição farmacológica do IRS1 em células primárias de pacientes com LMC.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Investigar o efeito da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 no fenótipo de células hematopoéticas leucêmicas BCR-ABL1⁺.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em células primárias de indivíduos saudáveis e de pacientes com LMC:

- A expressão gênica de *IRS1* e *IRS2*
- O efeito do inibidor de IGF1R-IRS1/2 NT157 na formação de colônias

Avaliar, em linhagem celular humana K562 BCR-ABL1⁺:

- O efeito do inibidor de IGF1R-IRS1/2 NT157 na viabilidade, proliferação, apoptose celular e na ativação da via PI3K/AKT/mTOR e MAPK
- O efeito do inibidor de IGF1R-IRS1/2 NT157 na modulação da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor
- O efeito do silenciamento mediado por lentivírus de *IRS1* ou *IRS2* na viabilidade celular

Avaliar, em modelos murinos de leucemia BCR-ABL1⁺:

- Em células Ba/F3 BCR-ABL1 e células Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}, avaliar o efeito do inibidor de IGF1R-IRS1/2 NT157 na viabilidade, proliferação, apoptose celular e na ativação da via PI3K/AKT/mTOR e MAPK *in vitro*, e o crescimento tumoral *in vivo*
- Em modelo murino de leucemia BCR-ABL1⁺ induzida através de transdução e transplante de medula óssea, avaliar o efeito do inibidor de IGF1R-IRS1/2 NT157 no fenótipo neoplásico e na sobrevida

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC FMRP USP) (Parecer CEP número 1.768.738; Anexo I) e da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (Parecer CEP número 1209/2011; anexo II), e os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras de medula óssea foram coletadas de pacientes com LMC atendidos no Ambulatório de Hematologia de ambas as instituições mencionadas no momento do diagnóstico da doença, previamente ao tratamento com inibidores tirosinoquinase. Amostras de 22 pacientes com diagnóstico de LMC e atendidos no HC FMRP USP foram incluídas no estudo de expressão gênica. Para os estudos de formação de colônias, foram incluídos pacientes com diagnóstico de LMC atendidos na Unicamp (n=2) e no HC FMRP USP (n=1). As características clínicas dos 25 pacientes incluídos no estudo estão detalhadas na Tabela 1. Amostras de doadores (n=9) de medula óssea para transplante alogênico aparentado atendidos no HC FMRP USP foram utilizadas para estudos de expressão gênica e amostras de sangue de cordão umbilical (n=4) da Unicamp foram utilizadas para ensaios de formação de colônias. Para a análise de expressão gênica de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC e da formação de colônias de pacientes com LMC foram coletados 4 mL de sangue de medula óssea em todos contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Para análise da formação de colônia de doadores saudáveis foram utilizados 15 mL de sangue de cordão umbilical coletados em citrato fosfato dextrose adenine (CPDA-1).

Tabela 1. Características dos pacientes com leucemia mieloide crônica

Pacientes	Número
Total	25
Gênero	
Masculino/Feminino	12/13
Idade (anos), mediana (intervalo):	51 (19-77)
Classificação OMS	
Fase crônica	22
Fase acelerada	2
Crise blástica	1

Abreviações: LMC, leucemia mieloide crônica; OMS, Organização Mundial da Saúde.

3.2 Linhagens celulares

As linhagens celulares K562, 293-T17 e WEHI-3B foram adquiradas no ATCC, Philadelphia, USA. As linhagens celulares Ba/F3, Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T3151} foram gentilmente cedidas pelo Dr Brian Druker do Knight Cancer Institute da Oregon Healthy and Science University, Oregon, EUA. As linhagens foram cultivadas seguindo recomendação do ATCC. A descrição das linhagens utilizadas está indicada na Tabela 2. As células K562 foram autenticadas utilizando-se a técnica de Short Tandem Repeat (STR) e todas as células foram testadas para a presença de *Mycoplasma* (MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit; Lonza Walkersville, MD, EUA, # LT07-710).

Tabela 2. Características das linhagens celulares

Células	Espécie	Tecido	Morfologia	Origem	Meio de cultura
K562	Humana	SP	linfoblasto	LMC em crise blástica	RPMI 10% SFB
293-T17	Humana	rim	epitelial	Células embrionárias de rim contendo antígeno SV40-T	DMEM 15% SFB
Ba/F3 parental	Murina	MO	linfoblasto	Pré Linfócito B	RPMI 10% SFB 10% WEHI-3B
Ba/F3 BCR-ABL1	Murina	MO	linfoblasto	Pré Linfócito B contendo vetor pMAX BCR-ABL1 (p210)	RPMI 10% SFB 10% WEHI-3B
Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T3151}	Murina	MO	linfoblasto	Pré Linfócito B contendo vetor pMAX BCR-ABL1 T315 (p210)	RPMI 10% SFB 10% WEHI-3B
WEHI-3B	Murina	SP	linfoblasto	leucemia	IMDM 10% SFB*

Abreviações: DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium. RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium, IMDM: Iscove's modified dulbecco's medium; SFB: soro fetal bovino, SP: sangue periférico, MO: medula óssea.

*Acrescentado ao meio 0,05 mM de 2-mercaptoetanol.

3.3 Reagentes

3.3.1 Meio de cultura

Os meios de cultura RPMI 1640, DMEM e IMDM (Thermo Fisher; #11875119, #11995073 e #12440-061, respectivamente) foram utilizados. A cada 500 mL de meio de cultura RPMI, foram adicionados 5 mL da solução contendo antibióticos penicilina e estreptomicina 10000 U/mL (Thermo Fisher; #15140163) e pelo menos 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, #63).

A cada 500 mL de meio de cultura DMEM, foram adicionados 5 mL da solução contendo antibióticos penicilina e estreptomicina 10000 U/mL, 50 mg do antibiótico normocina (Invivogen; #ant-nr-2), 10 mL de L-Glutamina (200 mM), 250 µg de anfotericina B e 205 µg de deoxicolato (Thermo Fisher; #15290026) e pelo menos 10% de SFB (Atlanta Biologicals; #S11550).

A cada 500 mL de meio de cultura IMDM, foram adicionados 5mL da solução contendo antibióticos penicilina e estreptomicina 10000 U/mL, 10mL de L-Glutamina (200 mM), 0,05 mM de 2-mercaptoetanol e 10% de SFB (Vitrocell, #63).

Ao meio de cultivo da linhagem celular Ba/F3 foi adicionado 10% de meio condicionado com IL3 (WEHI-3B).

3.3.2 Fármacos

O composto NT157 utilizado nos ensaios *in vitro* foi obtido da Axon Medchem (Groningen, Holanda) e diluído em DMSO. Para os ensaios *in vivo*, o composto NT157 foi obtido da Sun-shine Chemical Technology Corporation Limited (Wuhan, China) e diluído em 20% de 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (Sigma, MA, EUA, #H107) em água estéril, e diferentes concentrações foram testadas em linhagens celulares e células hematopoéticas CD34+ normais e células BCR-ABL1⁺ para se definir o IC50 e o tempo ideal de cultura. O fármaco mesilato de imatinibe (STI571) foi obtido da Selleckchem (TX, EUA) e diluído em DMSO (ensaios *in vitro*) ou em solução aquosa contendo 33% PEG 400, 5% glicose, 0,5% Tween80 e 5% Propileno Glicol (ensaios *in vivo*).

3.3.3 Partículas Lentivirais

Os shRNA controle não específico (sc-108080), shRNA específico para IRS1 (sc-29376) e o shRNA específico para IRS2 (sc-29378) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

3.4 Ensaios funcionais

Células hematopoéticas normais CD34+, células leucêmicas primárias BCR-ABL1⁺ e linhagens celulares humanas BCR-ABL1⁺ K562 e murinas Ba/F3 BCR-ABL1 ou Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} foram tratadas com veículo ou com o inibidor farmacológico de IGF1R-

IRS1/2, NT157, e submetidas a estudos de viabilidade, proliferação e apoptose conforme detalhado a seguir.

3.4.1 Avaliação do crescimento clonal em células hematopoéticas primárias

O crescimento clonal foi avaliado através da formação de colônias. Amostras de sangue de medula óssea ou de sangue de cordão umbilical foram submetidas à separação da fração mononuclear através de gradiente de densidade por centrifugação utilizando reagente Ficoll (Sigma-Aldrich #10771). O precipitado de células foi ressuscitado em solução salina *phosphate-buffered saline* (PBS) e $0,5 \times 10^3$ células viáveis foram cultivadas em meio semissólido de metilcelulose (MethoCult #4435; StemCell Technologies Inc., BC, Canadá) na ausência ou presença de NT157 em diferentes concentrações (Ø; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM). As colônias foram detectadas após 8-14 dias de cultura e a contagem diferencial de colônias eritrocíticas (CFU-E), granulocíticas (CFU-G), megacariocíticas (CFU-M), granulomonocíticas (CFU-GM) e multi-linhagem (CFU-GEMM) foi realizada através de diferenças morfológicas observadas ao microscópio convencional de acordo com o *Atlas of Human Hematopoietic Colonies* (StemCell Technologies).

3.4.2 Avaliação de viabilidade celular

Linhagens celulares foram cultivadas em placas de 96 wells (10000 células/100 µL). As linhagens celulares K562, Ba/F3 BCR-ABL1 ou Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} foram submetidas à privação de SFB por 12 horas e a contagem de células viáveis foi determinada por exclusão através de azul de tripan ou utilizando protocolo para reagente Guava Viacount (Guava Technologies, Inc., CA, EUA). Utilizando-se placa de 96 poços, 5×10^4 células foram plaqueadas por poço em meio RPMI 10% SFB na presença de NT157 em diferentes concentrações (Ø [DMSO]; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM). Após incubação por 24, 48 ou 72 horas a 37°C, adicionou-se 50 µg do reagente metiltiazoltetrazólio (MTT) e as células foram incubadas a 37°C por 4 horas. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de 0,1N HCl em isopropanol. A viabilidade foi avaliada pela mensuração da absorbância a 570 nm, utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em seis replicatas para três experimentos independentes. Os valores de IC₅₀ foram calculados por meio de regressão não linear, utilizando-se o programa CalcuSyn (Biosoft, MO, EUA) ou GraphPad Instat 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

3.4.3 Avaliação da proliferação celular

Linhagens celulares K562, Ba/F3 BCR-ABL1 ou Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e submetidas ao tratamento com NT157 (Ø [DMSO]; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM) por 48 horas, fixadas com etanol 70% e armazenadas em freezer - 20°C. As células foram lavadas 3 vezes com PBS 1% de SFB e ressuspensas em 200 µL de PBS a 1% SFB com 5 µL de anticorpo anti-Ki67 humano (Ki-67 FITC clone B56; BD Bioscience, CA, EUA). A média da intensidade de fluorescência de pelo menos 10000 eventos foi obtida através do aparelho FACSCalibur (BD Bioscience). Isótopo IgG foi utilizado como controle negativo. As análises foram realizadas com o programa FlowJo (Treestar, Inc., OR, EUA).

3.4.4 Avaliação da apoptose celular através da marcação com anexina V e iodeto de propídio

O estudo da apoptose foi realizado através da marcação das células com anexina V (annexin V-FITC ou APC/BD PharMingen, CA, EUA) e iodeto de propídio (Propidium Iodide[PI]/Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). As linhagens celulares K562, Ba/F3 BCR-ABL1 ou Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} foram submetidas à privação de SFB por dez horas e a contagem de células viáveis foi determinada por exclusão através de azul de tripan ou utilizando protocolo para reagente Guava Viacount. Utilizando-se placa de 24 poços, 2x10⁵ células foram plaqueadas por poço em meio RPMI 10% SFB na presença de NT157 em diferentes concentrações (Ø [DMSO]; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM). As amostras foram incubadas por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente e analisadas em equipamento FACSCalibur (BD Bioscience). Para cada amostra, foram adquiridos 10000 eventos. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) e analisados com o programa FlowJo (Treestar). As células positivas para anexina V, em relação ao número total de células, indicam células em processo de morte celular programada.

3.5 Ensaios moleculares

Células primárias de medula óssea de doadores saudáveis e de pacientes com LMC foram utilizadas para estudos de expressão gênica. Linhagens celulares humanas BCR-ABL1+ K562 e murinas Ba/F3 BCR-ABL1 ou Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} foram tratadas com

veículo ou NT157 e submetidas a estudos de expressão gênica e proteica conforme detalhado a seguir.

3.5.1 Extração de RNA

Para obtenção de RNA total, células de medula óssea foram coletadas em EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio e bicarbonato de amônio. O RNA de células foi isolado utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinski e Sacchi [155]. Linhagem celular K562 foi cultivada em meio apropriado e centrifugada para obtenção de precipitado contendo 5×10^6 a 1×10^7 células. Ao precipitado de células da medula óssea ou de linhagens celulares foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada até que se tornasse fluida. O RNA total das células foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific), utilizando 1 U da enzima para tratar 5 μ g de RNA por 15 minutos a temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genômico. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40 μ g/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas e essa varia normalmente entre 1,6 e 1,8.

3.5.2 PCR quantitativo em tempo real (PCRq)

A avaliação da expressão do RNA mensageiro de *IRS1*, *IRS2*, *BCL2*, *CDKN1A*, *MYC*, *FOS* e *JUN* foi verificada através de PCRq em tempo real utilizando as sequências de iniciadores listadas na Tabela 3. Com o objetivo de escolher a menor concentração dos iniciadores que obtivesse o menor ciclo *threshold* (Ct) com o maior delta de reporter normalizado (ΔRn), uma curva com as concentrações de 150 nM, 300 nM, e 600 nM foi realizada. A eficiência dos pares de iniciadores específicos para o *IRS1*, *IRS2* e *MYC* haviam sido previamente comprovadas [125, 146]. O PCRq foi realizado no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA).

Tabela 3. Iniciadores utilizados nas reações de PCR quantitativo (PCRq) em tempo real.

Gene	Concentração	Sequência dos Iniciadores
<i>IRS1</i>	600nM	FW: 5' TGA CCA TGC AGA TGA GTT GTC C 3' RV: 5' CGC ATG TCA GCA TAG CTT ACA G 3'
<i>IRS2</i>	300nM	FW: 5' GAGTGCACCCGTACCTATGGAA 3' RV: 5' GAAATCCGGCTTTACCTTGAAC T 3'
<i>MYC</i>	300nM	FW: 5' GCCCCTGGTGCTCCATGA 3' RV: 5' TTCCACAGAAACAACATCGATT 3'
<i>BCL2</i>	600nM	FW: 5' ACTGGAGAGTGCTGAAGATTG 3' RV: 5' AGTCTACTTCCTCTGTGATGTTG 3'
<i>E2F1</i>	150nM	FW: 5' CACAGATCCCAGCCAGTCTCTA 3' RV: 5' GAGAAGTCCTCCCGCACATG 3'
<i>CDKN1A</i>	300nM	FW: 5' TGT CAC TGT CTT GTA CCC TTG T 3' RV: 5' GCC GGC GTT TGG AGT GGT AG 3'
<i>FOS</i>	150nM	FW: 5' AGA ATC CGA AGG GAA AGG AA 3' RV: 5' CTT CTC CTT CAG CAG GTT GG 3'
<i>JUN</i>	300nM	FW: 5' CAG GTG GCA CAG CTT AAA CA 3' RV: 5' GTT TGC AAC TGC TGC GTT AG 3'
<i>ACTB</i>	150nM	FW: 5' AGG CCA ACC GCG AGA AG 3' RV: 5' ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A 3'
<i>HPRT</i>	150nM	FW: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3' RV: 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

Foi realizado PCRq para determinar a expressão dos genes nos pacientes selecionados e em controles normais. Cada amostra foi avaliada com iniciadores para os genes alvo e para os genes de referência (*HPRT1* e *ACTB*). Todas as reações foram realizadas em triplicata, usando a concentração de cDNA de 120 ng/uL. Amostras de 1 µg de RNA total foram transcritas reversamente em cDNA utilizando kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Thermo Fisher Scientific). Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. A amostra de um controle normal foi utilizada como amostra calibradora. A quantificação relativa das expressões de cada gene normalizado pela média dos genes de referência (*HPRT1* e *ACTB*) foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [156].

3.5.3 PCR array

Amostras de RNA total de células K562 tratadas com NT157 (1,6 µM) por 48 horas foram extraídas utilizando-se reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific) e transcritas utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific). PCR array foi realizado utilizando-se os kits para PCR array RT² Profiler™ PCR array Human Cancer PathwayFinder e PCR array RT² Profiler™ PCR array PI3K-AKT Signaling Pathway (#PAHS-033A e #PAHS-058A; SA Biosciences, MD, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As placas são constituídas por 96 poços, incluindo 12 controles de qualidade da

reação e 84 genes de interesse. Os dados obtidos no PCR *array* foram analisados em uma plataforma *online* disponibilizada pela empresa que forneceu as placas. Os níveis de expressão do RNAm foram normalizados por aqueles verificados nas células não tratadas e os genes que apresentaram variação ≥ 2 vezes (genes com expressão $<0,5$ e genes com expressão >2) foram incluídas no *heatmap* usando o programa *Multiple Experiment Viewer* (WebMeV) (<http://mev.tm4.org>). A amplificação foi realizada no ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystem).

3.5.4 Inibição específica de IRS1 e IRS2 mediada por lentivírus

Células K562 foram transduzidas com lentivírus contendo *short hairpin* RNA controle não específico, shRNA alvo IRS1 ou alvo IRS2 e nomeadas como células shControle e shIRS1 e shIRS2, respectivamente. Resumidamente, 2×10^5 células foram transduzidas com lentivírus através de inoculação por centrifugação por 30 minutos a 800 x g na presença de 3 $\mu\text{g/mL}$ de polibrene (Sigma, MO, EUA). O número de partículas virais por célula (*multiplicity of infection*; MOI) foi igual a 4. Após a transdução, as células foram selecionadas com 2 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina (Sigma, MO, EUA) por 15 dias antes dos experimentos. Após a seleção por puromicina, a expressão de IRS1 ou IRS2 foi determinada por PCRq e/ou *Western blot*.

3.5.5 Western blot

Ao precipitado celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 30 minutos a 4°C, sob agitação. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g, 4°C por 20 minutos para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotreitol e aqueceu-se em água fervente por 4 minutos. As amostras foram então submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C. Em seguida, o extrato proteico foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5 a 15% SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó integral sem açúcar, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl,

e 0,02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (3% leite em pó integral sem açúcar) por 12 horas a 4°C sob agitação e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0,02% Tween 20). O sistema de revelação usado foi baseado em quimioluminescência, utilizando-se o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate System (Thermo Fisher Scientific) e Gel Doc XR+ system (Bio-Rad). Os anticorpos utilizados estão listados na Tabela 5. A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão das proteínas endógenas actina ou GAPDH, e a intensidade da fosforilação proteica, através da expressão da proteína total correspondente. As imagens finais foram elaboradas a partir das porções do gel que contêm as bandas de interesse.

Tabela 4. Anticorpos específicos contra proteínas (totais ou fosforiladas) utilizados para análise de expressão proteica por *Western Blot*.

Empresa	Proteína alvo	Espécie	Catálogo	Diluição
Cell Signaling Technology (MA, USA)	4EBP1	coelho	9452	1:2000
	Caspase 3 clivada	coelho	9661	1:500
	ERK1/2	coelho	4695	1:2000
	IRS1	coelho	3407	1:250
	IRS2	coelho	3089	1:250
	p70S6K	coelho	2317	1:1000
	STAT3	camundongo	9139	1:1000
	STAT5	coelho	9363	1:1000
	p-4EBP1 ^{T70}	coelho	9455	1:1000
	p-ERK1/2 ^{T202/Y204}	coelho	9101	1:1000
	p-IRS1 ^{S636}	coelho	2388	1:500
	p-IGF1R ^{Y1135}	coelho	3918	1:500
	p-p70S6K ^{T389}	coelho	4858	1:1000
	p-STAT3 ^{Y705}	coelho	9131	1:500
	p-STAT3 ^{S727}	coelho	9134	1:250
	p-STAT5 ^{Y694}	coelho	9351	1:1000
Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)	p-IRS1 ^{S307}	coelho	33956	1:500
	c-Abl	coelho	H-300	1:500
Ambion (MA, USA)	GAPDH	camundongo	AM4300	1:4000
Millipore (MA, USA)	p-Tirosina	camundongo	05-321	1:5000

3.6 Estabelecimento de modelos murinos de LMC BCR-ABL1⁺ para ensaios *in vivo*

Camundongos BALB/c obtidos do Jackson Laboratory (Maine, USA) ou BALB/c nude obtidos do Charles River Laboratory (MA, EUA) foram utilizados na avaliação do efeito da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2, através do tratamento com NT157, em modelos animais expressando BCR-ABL1. Nestes modelos, avaliamos também o efeito do imatinibe e da combinação de NT157 com imatinibe. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso Animal da Oregon Health & Science University (Apêndice III). Modelo leucêmico induzido por transdução de vetor retroviral para expressão de BCR-ABL1 e transplante de medula óssea foi utilizado, conforme detalhado a seguir.

3.6.1 Modelo alográfico de tumorigênese induzida por célula Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}

Células Ba/F3 BCR-ABL1 ou BCR-ABL1^{T315I} foram cultivadas em meio RPMI 15% SFB na ausência de meio condicionado WEHI até atingirem crescimento exponencial e viabilidade igual a 95%. Fêmeas BALB/c nude receberam injeção subcutânea dorsal contendo 5×10^6 células Ba/F3 BCR-ABL1 viáveis e 20 camundongos BALB/c nude receberam injeção subcutânea dorsal contendo 5×10^6 células Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} viáveis ressuspensas em 50 μ L de PBS e 50 μ L de Matrigel (BD Biosciences #354263). Após o aparecimento de tumores (3 dias após a injeção) os animais foram divididos em 4 grupos: animais submetidos à administração de veículo (20% de 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin em água estéril) (n=5), NT157 (50 mg/kg/dia, 10 mL/kg, via intraperitoneal) (n=5), imatinibe (50 mg/kg/dia, 10 mL/kg, por gavagem) (n=5) e a combinação de NT157 e imatinibe (ambos 50 mg/kg/dia, 10 mL/kg) (n=5). Após 14 dias de tratamento, os tumores foram removidos e pesados.

3.6.2 Modelo leucêmico BCR-ABL1⁺ induzido por transdução e transplante de medula óssea

O vetor para expressão de BCR-ABL1 foi gentilmente cedido pelo Dr Elie Traer do *Knight Cancer Institute da Oregon Health and Science University*, Oregon, EUA.

Para a transfecção, células aderentes 293-T17 foram cultivadas até atingirem confluência igual 60%, idealmente ainda nas passagens ou em subculturas iniciais. Meio de cultura (DMEM) fresco foi adicionado anteriormente à transfecção. Em tubo estéril de 1,5 mL, a mistura de 740 μ L de Optimem (Thermo Fisher Scientific #11058021) e 60 μ L de

Fugene 6 (Promega #E2311) foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionaram-se então 30 µg de DNA Mig-p210 para expressão de BCR-ABL1 e 5 µg do plasmídeo pEco-Pac Helper, e a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A mistura Fugene/DNA foi adicionada cuidadosamente ao meio das células 293-T17 afim de que as células não se desprendessem do fundo da placa de Petri. O sobrenadante contendo partículas virais foi coletado 72 horas após a transfecção, centrifugado a 800 x g por 5 minutos e filtrado em membrana com poros de 0,45 µm para remoção de restos celulares. O sobrenadante foi armazenado a 4°C; o congelamento nessa etapa não é recomendado, pois reduz a eficiência viral.

Afim de verificar a eficiência de transdução do sobrenadante viral produzido em células 293-T17, células Ba/F3 foram transduzidas com retrovírus. Essa etapa representa um ponto de checagem anterior à transfecção das células dos animais. Um milhão de células Ba/F3 parentais foram ressuspensas em 3 mL de meio RPMI contendo 10% de SFB, penicilina e estreptomicina 10000 U/mL e 15% de meio condicionado WEHI-3B e transferidas para uma placa de 6 poços. Foram adicionados 30 µL de HEPES 1M (Gibco BRL #15630-080), 2 µL de polybrene (American Bioanalytical, MA, EUA, #AB011643) e 2 mL de sobrenadante viral. A suspensão foi homogeneizada, centrifugada a 1000 x g a 37°C por 90 minutos e incubada a 37°C por 24 horas. Após esse período, as células foram centrifugadas a 800 x g por 5 minutos, ressuspensas em PBS e submetidas à avaliação da expressão de GFP através de citometria de fluxo. A detecção de mais do que 3% de células marcadas com GFP indicou que 1 mL de sobrenadante viral era suficiente para os experimentos de transdução. A avaliação da expressão de GFP por citometria de fluxo de um experimento representativo é ilustrada na Figura 5.

Figura 5. Avaliação da expressão de GFP em células Ba/F3 parentais transduzidas com retrovírus para BCR-ABL1. *Dot plot* da análise por citometria de fluxo da expressão do gene repórter GFP, indicando a eficiência da transdução das células Ba/F3 parentais com retrovírus para indução da expressão de BCR-ABL1 (**A**). Foram adquiridos 50000 eventos e 3% das células viáveis analisadas apresentam expressão de GFP (**B**).

Para a transdução e o transplante de medula óssea, camundongos BALB/c machos doadores foram injetados com uma dose de 100 mg/kg de 5-fluorouracil (5-FU) (APP Pharmaceuticals, IL, EUA) e, após 4 dias, foram eutanasiados através de asfixia por inalação de isoflurano, quando tiveram os fêmures e as tíbias retirados. Cada animal doador forneceu aproximadamente $3\text{-}5 \times 10^6$ células, quantidade suficiente para dois animais receptores. Utilizando seringa e agulha de 26-gauge, a medula óssea foi extraída através do enxague com meio de cultura DMEM enriquecido com L-glutamina e 10% SFB. Ao precipitado celular foram adicionados 10 mL de solução de NH_4Cl (0,8% NH_4Cl e 0,1 mM EDTA em tampão KHCO_3 pH final 7.2 - 7.6), e a solução foi incubada em banho de gelo por 10 minutos para lise de hemácias. Após incubação, as células foram centrifugadas a $800 \times g$ por 5 minutos e o precipitado contendo leucócitos foi ressuscitado em confluência de aproximadamente $1,5\text{-}3 \times 10^6$ células/mL em meio enriquecido conforme indicado na Tabela 5. As citocinas IL3, IL6, SCF utilizadas foram obtidas de Peprotech (NJ, EUA).

Tabela 5. Concentração das citocinas adicionadas ao meio para estímulo de células de medula óssea coletadas de camundongos doadores.

DMEM	8,46 mL
Pen/strep (estoque 100x)	0,5 mL
L-Glutamina (estoque 100x)	1 mL
SFB (final 15%)	7,5 mL
Meio RPMI contendo IL3 WEHI-3B (final 15%)	7,5 mL
IL3 (final 7ng/mL – estoque 50µg/mL)	7 µL
IL6 (final 12ng/mL – estoque 100µg/mL)	6 µL
SCF (final 56ng/mL – estoque 100µg/mL)	28 µL
Volume Total	25 mL

A suspensão de células foi distribuída em placas de 6 poços (4 mL por poço) e incubada à 37°C por 24 horas. Após 24 horas as células foram ressuspensas em 2 mL de meio enriquecido, 2 mL do sobrenadante viral para indução da expressão de BCR-ABL1, 30 µL de HEPES 1M (Gibco BRL #15630-080) e 2 µL de polybrene (American Bioanalytical #AB011643) por poço e as células foram centrifugadas a 1000 x g a 37°C por 90 minutos. Para aumentar a eficiência da transdução, após 48 horas, as células foram novamente ressuspensas em 2 mL de meio enriquecido, 2 mL do sobrenadante viral para indução da expressão de BCR-ABL1, 30 µL de HEPES 1M (Gibco BRL #15630-080) e 2 µL de polybrene (American Bioanalytical #AB011643) por poço seguida de centrifugação a 1000 x g a 37°C por 90 minutos e as células foram incubadas a 37°C por 24 horas adicionais. Camundongos BALB/c fêmeas (n=20) receberam duas doses subletais de 450-cGy de irradiação gama separadas por intervalo de 3 horas. Aproximadamente 5x10⁵ células transduzidas foram ressuspensas em 100 µL de PBS e injetadas no plexo orbital das fêmeas após 24 horas da irradiação. Após o transplante, os animais permaneceram em caixas microisolantes e receberam água acidificada (pH 2,0) e antibiótico ciprofloxacino adicionado à água durante a recuperação pós-transplante. Sinais de morbidade, perda de peso, má evolução ponderal e esplenomegalia foram acompanhados diariamente. Amostras de sangue foram coletadas da veia safena lateral semanalmente, submetidas a contagem hematimétrica (SCIL Vet ABCTM Hematology Analyzer - Scil Animal Care Company, IL, EUA) e o tratamento foi iniciado quando o hemograma indicou reconstituição hematopoética. Dois tratamentos independentes foram realizados.

No primeiro tratamento, aos animais foram administrados veículo (20% de 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin em água estéril) (n=6), NT157 (100 mg/kg, 10 mL/kg) (n=6), imatinibe (100 mg/kg, 10 mL/kg) (n=6), e a combinação de NT157 e imatinibe (ambos 100

mg/kg, 10 mL/kg) (n=6). O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente.

No segundo tratamento, aos animais foram administrados veículo (20% de 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin em água estéril) (n=10), NT157 (70 mg/kg, 10 mL/kg) (n=10), imatinibe (70 mg/kg, 10 mL/kg) (n=10), e a combinação de NT157 e imatinibe (ambos 70 mg/kg, 10 mL/kg) (n=10). O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente.

Para ambos os tratamentos, quando o primeiro animal apresentou sinais de morbidade, metade dos animais em cada grupo foram eutanasiados através de asfixia por inalação de isoflurano. Os demais animais foram seguidos até o óbito ou apresentação de sinais de morbidade para análise de sobrevida. Fígado, baço, pulmões e fêmures foram retirados, pesados e fixados em formalina para análises futuras. Morbidade foi definida por perda de 10% do volume corporal, presença de infecção, ulceração ou incapacidade de comer ou beber, conforme recomendado pelo “Institutional Animal Care and Use Committee” (National Institutes of Health, WA, EUA).

3.7 Análise dos Resultados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Instat 5 (GraphPad Software, Inc.). Teste *t de Student*, *Mann–Whitney* ou ANOVA com pós-teste Bonferroni foram utilizados, conforme apropriado. A sobrevida dos camundongos foi descrita através da curva de Kaplan Meier e comparadas através do teste de *Log-rank*. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estudos utilizando células humanas primárias normais e BCR-ABL1⁺

4.1.1 Avaliação da expressão gênica de *IRS1* e *IRS2* em células de medula óssea de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC

O RNAm de *IRS1* apresentou-se menos expresso em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LMC (0,15 [0,01-4,13]), quando comparadas às amostras de células hematopoéticas normais (0,96 [0,22-39,78]) ($p < 0,0001$) (Figura 6A). A expressão de *IRS2* foi semelhante entre amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LMC quando comparadas às amostras de células hematopoéticas normais (0,75 [0,21-3,06] vs. 1 [0,39-2,87]; $p = 0,15$) (Figura 6B). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo-máximo].

Figura 6. Expressão de *IRS1*, mas não de *IRS2*, é diminuída em células de medula óssea de pacientes com LMC comparadas às amostras de células hematopoéticas normais. Expressão de *IRS1* (A) e *IRS2* (B) em células de medula óssea de pacientes com LMC (n=22) comparadas às amostras de células hematopoéticas normais (n=9) foi avaliada através de PCR quantitativo. A expressão relativa foi normalizada pela expressão do gene endógeno *HPRT1*. Os resultados foram obtidos através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os experimentos foram realizados em triplicata. O eixo y representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *IRS1* ou *IRS2*. As linhas horizontais representam a mediana. Valor estatisticamente significativo de p é indicado na figura.

4.1.2 Avaliação da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 em células hematopoéticas normais

Para investigar a toxicidade do NT157 sobre células hematopoéticas normais, células mononucleares de cordão umbilical foram submetidas ao ensaio de formação de colônia na presença de veículo ou do NT157. O tratamento com diferentes concentrações de NT157 (0,8, 3,2 e 6,4 μM) ou veículo (DMSO) por 14 dias não diminuiu a formação de colônia de células progenitoras normais. O número total de colônias formadas na presença de DMSO ou 0,8, 3,2 e 6,4 μM de NT157 foi 88, 84, 97 e 92, para o indivíduo #1; 103, 114, 97, e 94 para o indivíduo #2; 132, 119, 116 e 118 para o indivíduo #3 e 192, 175, 220 e 162 para o indivíduo #4. O número total de colônias e a especificação das colônias encontradas em cada situação nos diferentes indivíduos estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7. O tratamento com NT157 não inibe a formação de colônias de células de sangue de cordão umbilical de indivíduos saudáveis. Células mononucleares foram isoladas de sangue de cordão umbilical de indivíduos saudáveis e plaqueadas em meio semissólido enriquecido com citocinas e incubadas por 14 dias com diferentes concentrações de NT157 ou DMSO. Os resultados indicam o número de colônias formadas a partir de células progenitoras e diferenciadas em colônias eritrocíticas (CFU-E), granulocíticas (CFU-G), megacariocíticas (CFU-M), granulo-monocíticas (CFU-GM) e multi-linhagem (CFU-GEMM).

4.1.3 Avaliação da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 em células hematopoéticas de pacientes com LMC ao diagnóstico

Para investigar o efeito do NT157 sobre células hematopoéticas de pacientes com LMC ao diagnóstico, células mononucleares da medula óssea foram submetidas ao ensaio de formação de colônia na presença de veículo ou do NT157. O tratamento com 0,8, 3,2 e 6,4 μM de NT157 reduziu a formação de colônias a partir de células progenitoras de pacientes com LMC em 7%, 36% e 78% para o paciente #1; 29%, 19% e 62% para o paciente #2 e em 55%, 94% e 94% para o paciente #3 (Figura 8A). As colônias foram detectadas após 8-14 dias de cultura e a contagem diferencial de colônias CFU-E, CFU-G, CFU-M e CFU-GM foi realizada através de diferenças morfológicas observadas ao microscópio convencional (Figura 8B).

Figura 8. O tratamento com NT157 reduz a formação de colônias de células de pacientes com LMC ao diagnóstico. Células mononucleares foram isoladas de medula óssea de pacientes com LMC ao diagnóstico e plaqueadas em meio semissólido enriquecido com citocinas e incubadas por 14 dias com diferentes concentrações de NT157 ou DMSO. Os resultados indicam o número de colônias formadas a partir de células progenitoras e diferenciadas em colônias eritrocíticas (CFU-E), granulocíticas (CFU-G), megacariocíticas (CFU-M), grânulo-monocíticas (CFU-GM) (A). As fotografias ilustram a identificação das colônias através de sua morfologia, magnificação 40x (CFU-E, CFU-E e BFU-E) e 100x (CFU-GM) (B).

4.2 Estudos utilizando células humanas leucêmicas K562 BCR-ABL1⁺

4.2.1 A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 reduz a viabilidade e a proliferação em células K562

Células K562 foram submetidas ao tratamento com DMSO ou NT157 nas doses 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 μ M durante 24, 48 e 72 horas e foram então avaliadas quanto à viabilidade celular. Os valores encontrados para o IC₅₀ da citotoxicidade foram 9,8, 0,6 e 0,68 μ M para 24, 48 e 72 horas, respectivamente. As doses 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 μ M de NT157 reduziram a viabilidade celular em 1,3, 4,5, 8,5, 14, 19 e 20% após 24 horas, 2,5, 25, 37, 52, 60 e 62% após 48 horas e em 3, 12, 30, 60, 68 e 67% após 72 horas de tratamento (Figura 9A). Após 48 horas de tratamento com NT157 0,8, 1,6 e 3,2 μ M, a marcação com Ki-67 mostrou redução na proliferação celular de 10, 40 e 75%, respectivamente (Figura 9B-C).

Figura 9. O tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular e a proliferação de células K562. Viabilidade celular foi determinada por MTT em células K562 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) ou diluente (Ø; DMSO). As porcentagens indicam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. O valor de IC₅₀ para cada tempo de tratamento é indicado na figura (A). Proliferação celular foi determinada através da análise por citometria de fluxo da marcação com anticorpo anti-Ki67 em células K562 após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de NT157 (0,8; 1,6 e 3,2 μ M) ou diluente (Ø; DMSO). A intensidade de fluorescência indica a média de três experimentos independentes (B). Histograma representativo de um experimento (C). * $p=0,0002$, ** $p=0,0001$, *** $p<0,0001$. Teste One Way ANOVA e pós teste Bonferroni.

4.2.2 A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 induz apoptose em células K562

O tratamento com NT157 aumentou de forma significativa a população de células em apoptose identificada por marcação com anexina V (Figura 10A-B). As porcentagens de células apoptóticas ou anexina V+ verificadas na presença de DMSO ou das doses 0,2, 0,4, 0,8 e 3,2 μ M de NT157 foram 3, 2,5, 4, 5, 6,5 e 8% após 24 horas; 5, 7, 12, 23, 27 e 34% após 48 horas; 8, 9, 26, 56, 69 e 78% após 72 horas. A indução da apoptose celular foi confirmada através do aumento da clivagem de caspase 3, verificada por *Western Blot*, em extrato celular total de células K562 após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de NT157 (Figura 10C).

Figura 10. O tratamento com NT157 aumenta a apoptose em células K562. Apoptose foi determinada através da análise por citometria de fluxo da marcação com anexina V e iodeto de propídio em células K562 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) ou diluente ($\emptyset$, DMSO). Dot plot representativo de um experimento; os quadrantes inferior e superior do lado direito indicam a população de células apoptóticas (células anexina V+) (A). Os gráficos de barra indicam a média das porcentagens $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. Valores de p estão indicados na figura; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ para células tratadas com NT157 versus células não tratadas; teste One-way ANOVA e pós-teste Bonferroni (B). Tratamento com NT157 provocou aumento nos níveis de caspase 3 clivada, conforme observado por Western blot (C).

4.2.3 O tratamento com NT157 inibe a via IGF1R-IRS1/2 e STAT3/5 em células K562

O tratamento com NT157 reduziu a expressão proteica de IRS1, IRS2, aumentou a fosforilação de IRS1 no sítio inibitório serina 307, inibiu a via PI3K/AKT (redução de p-4EBP1 e p-p70S6K) e MAPK (redução de p-ERK1/2). NT157 reduziu a ativação de STAT3 e STAT5, conforme observado pela redução da fosforilação em sítios ativadores das respectivas proteínas. NT157 reduziu a expressão de BCR-ABL1 (Figura 11).

Figura 11. Exposição ao composto NT157 inibe a via IGF1R-IRS1/2 e STAT3/5 em células K562. Células K562 tratadas com NT157 (0,4, 0,8 e 1,6 μM) ou veículo ($\emptyset$, DMSO) durante 48 horas foram submetidas a extração de proteínas totais e análise dos níveis de expressão e fosforilação proteica através de *Western Blot*. As membranas foram incubadas com o anticorpo para a detecção da respectiva proteína total ou GAPDH, utilizada como controle. A revelação foi realizada com o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, em aparelho Gel Doc XR+.

2.4. A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 reduz a expressão de oncogenes e aumenta a expressão de genes supressores de tumor em células K562

O tratamento com NT157 demonstrou exercer efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos em células K562. Para avaliarmos potenciais genes modulados através da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 que justificassem os efeitos antineoplásicos observados, investigamos a expressão de 84 oncogenes e genes supressores de tumor e/ou 84 genes da via PI3K/AKT (Apêndice IV). Foram encontrados 71 genes cuja expressão foi modulada em pelo menos 2 vezes após tratamento com NT157, o que significa genes com expressão $<0,5$ e genes com expressão >2 em comparação às células não tratadas (Figura 12A). Os genes *MYC*, *BCL2*, *CDKN1A*, *E2F1*, *FOS* e *JUN* foram selecionados para validação da expressão do RNAm utilizando iniciadores específicos para PCRq (Figura 12B).

A

K562 tratadas com NT157

B

Genes	Fold-change
MYC	0.21
E2F1	0.23
BCL2	0.44
CDKN1A	15.09
FOS	17.05
JUN	21.41

Figura 12. Perfil da expressão de oncogenes, supressores de tumor e genes da via PI3K/AKT moduladas por NT157 em células K562. O heatmap ilustra os genes modulados pelo tratamento com NT157 1,6 µM por 48 horas em células K562; genes cuja expressão foi modulada em pelo menos 2 vezes após tratamento com NT157; o que significa genes com expressão <0,5 (verde), e genes com expressão >2 (vermelho) comparados às células não tratadas estão indicados. Os genes modulados e contidos nos painéis *CancerPathwayFinder* e *PI3K-AKT Signaling Pathway* estão indicados (A). Os genes MYC, BCL2, CDKN1A, E2F1, FOS e JUN foram selecionados para validação por PCRq (B).

Os ensaios de PCRq validaram o aumento da expressão dos genes supressores de tumor *CDKN1A*, *FOS* e *JUN* e a redução dos oncogenes *MYC* e *BCL2*. A expressão de *E2F1*, que inicialmente mostrou-se diminuída na análise do PCR *array*, foi encontrada aumentada na validação por PCRq (Figura 13).

Figura 13. Validação de resultados de PCR *array* usando PCRq. Células K562 tratadas com DMSO ou 1,6 µM de NT157 por 48 horas foram submetidas a avaliação da expressão gênica utilizando-se sequências de iniciadores específicos para *MYC* (A), *BCL2* (B), *CDKN1A* (C), *E2F1* (D), *FOS* (E) e *JUN* (F). Os gráficos de barras representam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Teste *t* de Student.

4.2.4 A inibição específica através de lentivírus de IRS1, mas não de IRS2, reduz a viabilidade em células K562.

O efeito do silenciamento de IRS1 em células K562 foi previamente avaliado pelo nosso grupo de pesquisa [146] e foi confirmado durante a realização do presente trabalho. Células K562 foram submetidas à inibição específica de IRS1 mediada por lentivírus. Após confirmação da inibição da expressão gênica de *IRS1* (Figura 14A), as células foram submetidas à deprivação de soro por 12 horas e então submetidas a avaliação da viabilidade

celular por MTT. A inibição de IRS1 resultou em diminuição da viabilidade celular em K562 após 48 horas de privação de soro (Figura 14B).

Figura 14. O silenciamento de IRS1 diminui a viabilidade celular em células K562. Células K562 foram transduzidas com shRNA controle não específico (shControle) ou shRNA específico para IRS1 (shIRS1). Os níveis relativos do RNAm de IRS1 foram comparados entre células shIRS1 e células shControle (**A**). Os experimentos foram realizados em triplicata. A viabilidade celular foi determinada através de ensaio de MTT em células shControle e células shIRS1 48 horas após deprivação de soro (**B**). As porcentagens indicam a média±desvio padrão de 3 experimentos independentes. Valores de p estão indicados na figura; * $p<0.05$; Teste t de student.

Para verificar o papel de IRS2 na viabilidade das células leucêmicas K562, células K562 foram submetidas à inibição específica de IRS2 mediada por lentivírus e então avaliadas quanto à viabilidade celular através de ensaio de MTT. A eficiência da inibição gênica foi avaliada através de PCRq (Figura 15A) e a eficiência da inibição proteica através de *Western Blot* (Figura 15B). A inibição de IRS2 resultou em aumento na viabilidade celular em K562 (Figura 15C).

Células K562

Figura 15. O silenciamento de IRS2 aumenta a viabilidade celular em células K562. Células K562 foram transduzidas com shRNA controle não específico (shControle) ou shRNA específico para IRS2 (shIRS2). Os níveis relativos do RNAm de *IRS2* foram avaliados em células shIRS2 e shControle (**A**). Os experimentos foram realizados em triplicata. A expressão proteica de IRS2 foi avaliada por *Western blot* em extratos celulares totais de shControle e shIRS2 (**B**). As membranas foram imunoblotadas com anticorpo para detecção de IRS2 e actina, e reveladas utilizando-se os sistemas SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate e Gel Doc XR+. A viabilidade celular foi determinada através de ensaio de MTT em células shControle e shIRS2 (**C**). As porcentagens indicam a média±desvio padrão de 3 experimentos independentes. Valores de *p* estão indicados na figura; **p*<0.05; Teste *t* de student.

4.3 Estudos utilizando modelos murinos BCR-ABL1⁺

4.3.1 A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 reduz a viabilidade de células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}

Ba/F3 é uma linhagem celular murina dependente de IL3. Quando o oncogene humano BCR-ABL1 é introduzido através de retrovírus, as células adquirem capacidade de crescimento independente de IL3 [157]. Usando Ba/F3 parental e os modelos Ba/F3 BCR-

ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}, foi avaliado o efeito de NT157 sobre a viabilidade celular na presença ou não de IL3 (meio condicionado por células WEHI-3B).

Os ensaios com Ba/F3 parental indicaram que NT157 foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular apenas nas células cultivadas na presença do meio condicionado contendo IL3, indicando que NT157 inibe vias de sinalização intracelulares relacionadas com fatores de crescimento (Figura 16).

Os ensaios com Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}, na presença ou ausência de IL3, indicaram que o tratamento com NT157 foi capaz de reduzir a viabilidade celular em ambas as células testadas, mostrando que NT157 inibe as vias de sinalização celular ativadas pelo potencial oncogênico de BCR-ABL1 e BCR-ABL1^{T315I}. A redução na viabilidade celular ocorreu de forma dose e tempo dependente, sendo que o tratamento com NT157 por 24 horas nas doses $\geq 0,8 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$) e por 48 e 72 horas nas doses $\geq 0,2 \mu\text{M}$ ($p < 0,001$) diminuíram a viabilidade celular de forma significativa (Figura 16).

Células Ba/F3

Figura 16. O tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular em células Ba/F3. A viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT em células Ba/F3 parental, Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} tratadas com NT157 ou veículo durante 24, 48 e 72 horas. O resultado foi normalizado pela viabilidade de células parentais não tratadas na presença de meio condicionado WEHI-3B. Os gráficos de barras representam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Valores de p são indicados nos gráficos; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ para as células tratadas com NT157 versus células não tratadas; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni foram utilizados.

Os resultados encontrados na análise de viabilidade celular foram utilizados no cálculo do IC₅₀ da citotoxicidade após 24, 48 e 72 horas de tratamento (Figura 17).

Células Ba/F3

Figura 17. Valores de IC₅₀ para o tratamento com NT157 em células Ba/F3. Os dados obtidos no experimento de viabilidade por MTT foram utilizados para o cálculo do IC₅₀ usando GraphPad Prism 5.

4.3.2 A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 aumenta a apoptose de células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}

Os ensaios de apoptose com Ba/F3 parental indicaram que NT157 foi capaz de induzir a apoptose de forma significativa nas células cultivadas na presença do meio condicionado contendo IL3, indicando que NT157 induz apoptose nas células cultivadas sob estímulo de fatores de crescimento. Na ausência de meio contendo IL3, as células Ba/F3 parentais apresentaram aumento de apoptose de forma espontânea, o que foi potencializado pelo tratamento com NT157 (Figura 18).

Os ensaios com Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}, na presença ou ausência de IL3, indicaram que o tratamento com NT157 foi capaz de induzir a apoptose em ambas as células testadas. O aumento na apoptose ocorreu de forma dose e tempo dependente, sendo que o tratamento com NT157 por 24 horas nas doses $\geq 0,8 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$) e por 48 e 72 horas nas doses $\geq 0,4 \mu\text{M}$ ($p < 0,001$) aumentaram a porcentagem de células positivas para a marcação com anexina V de maneira significativa (Figura 18A-C). Após 72 horas de tratamento, doses acima de $0,8 \mu\text{M}$ não permitiram análise de apoptose devido à ausência de células íntegras para aquisição no citômetro de fluxo. Os resultados foram comprovados através da avaliação da clivagem de caspase 3 por *Western Blot* (Figura 18D).

Células Ba/F3

A

Com meio condicionado WEHI-3B

NT157 (µM)

Ø

0,2

0,4

0,8

1,6

3,2

Células Ba/F3

B

Sem meio condicionado WEHI-3B

NT157 (µM)

Parental

BCR-ABL1

BCR-ABL1 T315I

Células Ba/F3

C

D

Figura 18. O tratamento com NT157 aumenta a apoptose em células Ba/F3. Análise da apoptose detectada por citometria de fluxo. Células Ba/F3 parental, Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} tratadas com NT157 (0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 μM) ou veículo ($\emptyset$, DMSO) durante 24, 48 e 72 horas usando marcação com anexina V/PI. São ilustrados gráficos de *dot plot* representativos. Os quadrantes inferiores do lado direito contêm a população apoptótica (células anexinas V+) (A-B). Os gráficos de barras representam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Valores de p são indicados nos gráficos; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ para as células tratadas com NT157 *versus* células não tratadas; one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (C). O aumento da apoptose foi confirmado pela avaliação da clivagem de caspase 3 através de *Western Blot* (D).

4.3.3 NT157 inibe a expressão de Irs1 e a ativação de Erk1/2 em células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}

Com base nos resultados de viabilidade celular e apoptose, os modelos em que a viabilidade celular é suportada pelo potencial oncogênico do gene de fusão BCR-ABL1, Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} deprivadas de IL3 foram utilizadas para os estudos de sinalização celular.

Em células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}, NT157 inibiu a expressão de Irs1 total, através do aumento da fosforilação de Irs1 no sítio da serina 307, que resulta na degradação da proteína [95]. Em ambas as células, NT157 inibiu a ativação de Erk1/2, conforme evidenciado pela redução da fosforilação em treonina 202 e tirosina 204. Diferente do que foi observado nas células K562 (Figura 11), o NT157 não reduziu a expressão de BCR-ABL1 nas células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} (Figura 19A-B).

Figura 19. Análise de *Western blot* para extratos celulares totais de células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}. Células Ba/F3 BCR-ABL1 (A) e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} (B) tratadas com NT157 (0,4, 0,8 e 1,6 μM) ou veículo (Ø, DMSO) durante 48 horas. As membranas foram incubadas com o anticorpo para a detecção da respectiva proteína total ou Gapdh.

4.3.4 Avaliação do efeito do NT157 e imatinibe como monoterapia ou em combinação no crescimento de tumor induzido em células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} *in vivo*

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito do tratamento com NT157, imatinibe ou a combinação de NT157 e imatinibe na formação de tumor de células Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} *in vivo*. Um total de 5×10^6 células Ba/F3 BCR-ABL1 ou BCR-ABL1^{T315I} foram implantadas em fêmeas BALB/c por injeção subcutânea. Três dias após a injeção subcutânea das células, foi observada a formação de tumor e iniciado tratamento com o veículo ou os inibidores farmacológicos de IGF1R-IRS1/2 (NT157 50mg/kg/dia via intraperitoneal) e/ou imatinibe (50mg/kg/dia por gavagem). Os inibidores farmacológicos nas doses testadas, após 14 dias de tratamento, não resultaram em redução do tamanho dos tumores em ambas as células (Figura 20A-B).

Figura 20. O inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2 e/ou imatinibe não modularam o crescimento de tumor induzido por células Ba/F3 BCR-ABL1 e células Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}. Medição do tumor (peso) induzidos pela injeção subcutânea de 5×10^6 células Ba/F3 BCR-ABL1 (A) ou BCR-ABL1^{T315I} (B) em fêmeas BALB/c. Três dias após a injeção das células, foi observado formação de tumor e iniciado o tratamento com veículo (20% de 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin via intraperitoneal), NT157 (50 mg/kg/dia via intraperitoneal), imatinibe (50 mg/kg/dia via gavagem) e a combinação de NT157 e imatinibe (ambos 50 mg/kg/dia). Os animais foram eutanasiados e os tumores ressecados após 14 dias de tratamento. Os tratamentos não modularam o crescimento do tumor; one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4.3.5 Efeito do NT157 e do imatinibe como monoterapia ou em combinação em modelo animal de leucemia BCR-ABL1⁺

Para a análise do efeito do tratamento com o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2 como monoterapia ou combinado com imatinibe em modelos *in vivo*, utilizamos um modelo animal de leucemia induzido pelo transplante de células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1. Estes experimentos foram realizados no laboratório do Dr. Brian Druker no *Knight Cancer Institute* da *Oregon Health and Science University*, em Portland, Oregon.

Inicialmente, cada animal foi injetado, via plexo orbital, com 4×10^5 células transduzidas com o sobrenadante viral para expressão do BCR-ABL1 (Mig-p210). Através de citometria de fluxo, foi verificado que 1,5% das células injetadas expressavam GFP no dia do transplante. Após reconstituição hematopoética (11 dias pós-transplante), 6 camundongos foram incluídos em cada grupo de tratamento: veículo, 100 mg/kg de NT157, 100 mg/kg de imatinibe e combinação de 100 mg/kg de NT157 e 100 mg/kg de imatinibe. O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente (Figura 21).

Figura 21. Representação esquemática do desenvolvimento de modelo animal de leucemia BCR-ABL1⁺. O experimento inicial incluiu 24 fêmeas receptoras, que foram injetadas com 4×10^5 células transduzidas com BCR-ABL1 no dia 0 do transplante. O tratamento foi iniciado 11 dias pós-transplante e os animais foram divididos em 4 grupos de tratamento: veículo, 100 mg/kg de NT157, 100mg/kg de imatinibe, 100mg/kg de NT157 combinado com 100mg/kg de imatinibe. O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. A eutanásia foi realizada quando o primeiro animal demonstrou sinais de morbidade (20 dias pós-transplante) e o restante dos animais foram monitorados por até 41 dias pós-transplante para análise da sobrevivência.

Os animais foram submetidos a coleta de sangue da veia safena lateral semanalmente e submetidos a contagem hematimétrica. Quando o primeiro sinal de morbidade foi observado no grupo controle (20 dias pós-transplante), 3 animais foram eutanasiados em cada grupo. No dia da eutanásia, os animais foram submetidos a contagem hematimétrica e pesagem de fígado e baço. A avaliação dos parâmetros laboratoriais no dia da eutanásia indicou que não houve diferença significativa para a contagem de células GFP positivas no sangue periférico, contagem de leucócitos, valores de hemoglobina e contagem de plaquetas entre os diferentes grupos (Figura 22A-D) (Tabela 6). Foi observada redução do peso do baço nos animais tratados com a combinação de NT157 100mg/kg e imatinibe 100mg/kg (média=0,15g; mínimo=0,13g - máximo=0,16g) comparados com o grupo de animais que recebeu apenas o

veículo (média=0,42g; mínimo=0,37g – máximo=0,48g) e comparados com o grupo que recebeu apenas o imatinibe (média=0,43g; mínimo=0,38g – máximo=0,47g) (ambos $p<0,05$). Não houve diferença no peso do fígado entre os diferentes grupos (Figura 22E-F) (Tabela 7).

A variação percentual do peso dos animais no D0 do procedimento do transplante de células transduzidas contendo BCR-ABL1 e no dia da eutanásia (D20 pós-transplante) foi significativamente diferente entre os grupos. Animais tratados com veículo ou NT157 apresentaram redução significativa do peso corporal comparados aos animais tratados com imatinibe ou a combinação de NT157 e imatinibe; $p<0,05$. A comparação da variação do percentual do peso corporal entre o início do tratamento (D11) e o dia da eutanásia (D20) evidenciou que o tratamento com NT157 combinado com imatinibe preveniu a perda de peso corporal quando comparado aos animais tratados com veículo ($p<0,05$), mas não houve diferença significativa na comparação da variação do peso corporal entre os demais grupos (Figura 23) (Tabela 7).

Três animais de cada grupo foram monitorados por até 41 dias pós-transplante para comparação da sobrevida entre os grupos. A sobrevida foi significativamente maior no grupo tratado com imatinibe *versus* veículo ($p=0,02$), e no grupo tratado com imatinibe *versus* NT157 ($p=0,02$). A mediana de sobrevida dos animais tratados com veículo ou com NT157 foi de 27 dias e dos animais tratados com a combinação de NT157 com imatinibe não foi atingida (ambos $p=0,09$). A sobrevida não diferiu entre os demais grupos (controle *versus* NT157, NT157 *versus* tratamento combinado, imatinibe *versus* tratamento combinado) (Figura 24).

Figura 22. Tratamento com NT157 e/ou imatinibe em camundongos submetidos a transplante de células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1. Os animais tratados com veículo (n=3), com 100 mg/kg NT157 (n=3), com 100 mg/kg de imatinibe (n=3) ou com 100 mg/kg de NT157 combinado com 100 mg/kg de imatinibe (n=3) foram eutanasiados 20 dias pós-transplante. O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. Amostras de sangue periférico foram coletadas no dia da eutanásia e submetidas a avaliação de células GFP positivas (A) contagem de leucócitos (B), hemoglobina (C), plaquetas (D) e os animais tiveram o baço (E) e fígado (F) coletados e pesados. A barra horizontal indica a média dos valores. Valores de *p* significativos são indicados nos gráficos; * *p*<0,05; one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 6. Valores hematimétricos no dia da eutanásia no experimento 1.

Tratamento	Animal	GFP (%)	Leuco ($10^3/\text{mm}^3$)	Ht (%)	Plaqueta ($10^3/\text{mm}^3$)	Linfo (%)	Mono (%)	Gran (%)
Veículo	809	5	17	40	300	56	9	35
	821	11	75,2	39	916	37	10	53
	822	2,5	22,8	27	316	49	7	43
NT157 (100mg/kg)	807	2	27	53	898	42	8	50
	812	0	12,2	21	536	31	8,5	60
	811	0	8,4	45	494	50	8	42
Imatinibe (100mg/kg)	820	2	8,6	35	818	54	6	40
	804	4	50,8	46	686	61	7,5	31
	823	9	69,8	42	1702	36	5	60
Combinação	813	3	10	45	1166	39	8	52
	814	0	14,4	41	1234	46	7	47
	815	0	7,4	21	542	29	8	63

Valores de referência: Leucócitos: $3\text{-}15 \times 10^3/\text{mm}^3$; Hematócrito: 36-52 %; Plaquetas: $140\text{-}600 \times 10^3/\text{mm}^3$. As porcentagens de GFP, linfócitos, monócitos e granulócitos não possuem valores de referência.

Figura 23. Variação do peso corporal de animais transplantados com células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1 e tratadas com veículo, NT157 e/ou imatinibe. O experimento inicial incluiu 12 fêmeas receptoras, que foram injetadas com 4×10^5 células no dia 0 do transplante. O tratamento foi iniciado 11 dias pós-transplante e os animais foram divididos em 4 grupos de tratamento: veículo, 100 mg/kg de NT157, 100mg/kg de imatinibe, 100mg/kg de NT157 combinado com 100mg/kg de imatinibe. O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. Os animais foram pesados no dia do transplante de células transduzidas com BCR-ABL1 (D0), no dia do início do tratamento (D11) e no dia da eutanásia (D20 pós transplante). As variações do peso corporal entre o D0 e D20 (A) e entre D11 e D20 (B) estão ilustradas. A variação do peso corporal em percentagem é indicada no eixo y do gráfico. Valores de p significativos são indicados nos gráficos; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$; one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 7. Tamanho dos órgãos no dia da eutanásia no experimento 1.

Tratamento	#	Peso D0	Peso D11	Peso D20	$\Delta\%$ Peso D0-D20	$\Delta\%$ Peso D11-D20	Baço (g)	Fígado (g)
Veículo	809	18,2	19,2	14,2	-22	-26	0,409	1,07
	821	17,9	17,3	14,7	-18	-15	0,480	1,80
	822	17,3	17,3	14,3	-17	-17	0,372	1,26
NT157 (100mg/kg)	807	18,7	18,3	15,1	-19	-17,5	0,373	1,12
	812	17,6	16,6	15,9	-10	-4	0,478	1,50
	811	17,8	17,8	15,1	-15	-15	0,177	0,98
Imatinibe (100mg/kg)	820	18,3	18,3	17,6	-4	-4	0,467	1,21
	804	17,5	17,5	18	3	3	0,378	1,07
	823	18,4	18,4	16	-13	-13	0,455	2,31
Combinação	813	16	16	16,3	2	2	0,136	0,839
	814	17,6	17,6	17,7	1	0	0,149	0,979
	815	17,1	17,6	17,4	2	-1	0,165	0,879

Símbolos: # indica o número do animal; Δ indica variação.

Figura 24. Curva de sobrevivência de animais transplantedados com células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1 e tratados com veículo, NT157 e/ou imatinibe. Doze fêmeas receptoras foram injetadas com 4×10^5 células no dia 0 do transplante, randomizadas em 4 grupos de tratamento ($n=3/\text{grupo}$) e monitoradas por até 45 dias pós-transplante para análise de sobrevivência. O tratamento foi iniciado 11 dias pós-transplante: veículo, 100 mg/kg de NT157, 100mg/kg de imatinibe, 100mg/kg de NT157 combinado com 100mg/kg de imatinibe. NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. A sobrevivência dos camundongos é ilustrada através das curvas de Kaplan Meier e comparadas usando Log-Rank; * $p=0,02$ comparado ao veículo; ** $p=0,02$ comparado ao NT157. A mediana de sobrevivência para cada grupo está indicada para cada grupo de tratamento. O dia após transplante é indicado no eixo x e a percentagem de animais vivos é indicada no eixo y.

Os resultados obtidos no primeiro experimento sugerem que a combinação do tratamento com NT157 e imatinibe é mais eficaz do que ambas as terapias isoladas no controle da esplenomegalia observada nos animais.

Um segundo experimento foi conduzido para análise do efeito do tratamento com veículo, 70 mg/kg de NT157 e/ou 70mg/kg de imatinibe; NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. (Figura 25). Cada animal foi injetado com 5×10^5

células transduzidas com o sobrenadante viral para expressão do BCR-ABL1 (Mig-p210). Através de citometria de fluxo, foi verificado que 2,8% das células injetadas expressavam GFP no dia do transplante. Após reconstituição hematopoética (17 dias pós-transplante), foram incluídos 10 animais em cada grupo de tratamento (veículo, 70 mg/kg de NT157, 70 mg/kg de imatinibe e combinação 70 mg/kg de NT157 e 70 mg/kg de imatinibe).

Figura 25. Representação esquemática do desenvolvimento de modelo animal de leucemia BCR-ABL1⁺. O experimento inicial incluiu 40 fêmeas receptoras, que foram injetadas com 5×10^5 células no dia 0 do transplante. O tratamento foi iniciado 17 dias pós-transplante e os animais foram divididos em 4 grupos de tratamento: veículo (n=10), 70 mg/kg de NT157 (n=10), 70 mg/kg de imatinibe (n=10) e combinação de 70 mg/kg de NT157 e 70 mg/kg de imatinibe (n=10). O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. A eutanásia foi realizada quando o primeiro animal demonstrou sinais de morbidade (22 dias pós-transplante) e o restante dos animais foram monitorados por até 45 dias pós-transplante para análise da sobrevivência.

Quando o primeiro sinal de morbidade foi observado no grupo controle (22 dias pós-transplante), 5 animais foram eutanasiados em cada grupo. No dia da eutanásia, os animais foram submetidos a contagem hematimétrica e pesagem de fígado e baço. Os parâmetros analisados não diferiram entre os grupos (Figura 26A-F) (Tabelas 8-9). O percentual da variação do peso dos animais no D0 e no dia da eutanásia (D22) e a variação do peso corporal entre o início do tratamento (D17 pós-transplante) e o dia da eutanásia (D22) não diferiu entre os grupos (Figura 27) (Tabela 9).

Os demais animais foram monitorados por até 45 dias pós-transplante para comparação da sobrevivência entre os grupos. A sobrevivência foi significativamente maior nos grupos tratados com imatinibe e na combinação NT157 e imatinibe quando comparada ao grupo tratado com veículo (ambos $p=0,009$), mas não diferiu entre os demais grupos (controle *versus* NT157, NT157 *versus* imatinibe, NT157 *versus* tratamento combinado, imatinibe *versus* tratamento combinado) (Figura 28).

Figura 26. Tratamento com NT157 em camundongos submetidos a transplante de células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1. Os animais tratados com veículo (n=4), com 70 mg/kg de NT157 (n=4), com 70 mg/kg de imatinibe (n=4) ou com 70 mg/kg de NT157 combinado com 70 mg/kg de imatinibe (n=5) foram eutanasiados 22 dias pós-transplante. O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. Amostras de sangue periférico foram coletadas no dia da eutanásia e submetidas a avaliação de células GFP positivas (A), contagem de leucócitos (B), hemoglobina (C), plaquetas (D) e os animais tiveram o baço (E) e fígado (F) coletados e pesados. A barra horizontal indica a média dos valores. Não houve diferença significativa entre os grupos; one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 8. Valores hematimétricos obtidos no dia da eutanásia no experimento 2.

Tratamento	Animal	GFP (%)	Leuco ($10^3/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Plq ($10^3/\text{mm}^3$)	Linfo (%)	Mono (%)	Gran (%)
Veículo	27	61	52,8	23,2	2948	55	5	40
	29	59	36	22	1872	46,5	7	46,5
	19	56	5,6	14,4	252	70	7	23
	23	56	14	22,4	648	69,5	7	23,5
NT157 (70mg/kg)	26	50	23,8	15,4	430	47	8	45
	16	65	35	22,8	1026	36	6	58
	28	59	95,4	25,8	1170	42	7	51
	17	62	43,8	21,2	864	66	6	28
Imatinibe (70mg/kg)	32	69	7,2	25,2	918	36,5	9	54,5
	2	54,5	6	18,4	476	64	8	28
	37	57	37,8	22	1528	62	6	32
	40	25	10,2	22,2	924	41	11	48
Combinação	39	53	41,2	18,8	1260	60	9	31
	35	56	19	24,8	1084	44	7	49
	4	74	87,2	24,6	1716	66	4	30
	34	64	71,8	26	1104	29	9	62
	20	55	10	19,6	932	46	5,5	48,5

Valores de referência: Leucócitos: $3-15 \times 10^3/\text{mm}^3$; Hematócrito: 36-52 %; Plaquetas: $140-600 \times 10^3/\text{mm}^3$. As porcentagens de GFP, linfócitos, monócitos e granulócitos não possuem valores de referência.

Tabela 9. Tamanho dos órgãos no dia da eutanásia no experimento 2.

Tratamento	#	Peso D0	Peso D17	Peso D22	$\Delta\%$ Peso D0-D22	$\Delta\%$ Peso D17-D22	Baço (g)	Fígado (g)
Veículo	27	15,8	16,5	13,1	-17	-21	0,212	1,78
	29	15,7	16,9	14,9	-5	-12	0,285	1,539
	19	17,9	18,1	17,8	-1	-2	0,6	1,085
	23	18	19,6	19	+6	-3	0,274	1,005
NT157 (100mg/kg)	26	16,6	16,6	15,5	-7	-7	0,224	1,039
	16	14,6	14,4	12,9	-12	-10	0,193	1,47
	28	16,6	16,1	15,1	-9	-6	0,288	1,75
	17	17,9	17,1	16,1	-10	-6	0,278	1,479
Imatinibe (100mg/kg)	32	17,9	18,9	17,8	-1	-6	0,283	1,301
	2	17	17,5	18,2	+7	4	0,201	1,153
	37	16,6	18,2	16,5	-1	-9	0,283	1,413
	40	17,5	17,4	17,3	-1	-1	0,317	1,198
Combinação	39	15,9	17,9	18,7	+18	4	0,236	1,012
	35	18,2	18,9	18,6	+2	-2	0,214	1,264
	4	18,2	17,1	15,5	-15	-9	0,395	1,92
	34	16,8	17,4	16,9	+1	-3	0,257	1,917
	20	16,4	17,5	16,1	-2	-8	0,358	1,75

Símbolos: # indica o número do animal; Δ indica variação.

Figura 27. Variação do peso corporal de animais transplantados com células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1 e tratadas com veículo, NT157 e/ou imatinibe. O experimento inicial incluiu 40 fêmeas receptoras, que foram injetadas com 5×10^5 células no dia 0 do transplante. O tratamento foi iniciado 17 dias pós-transplante e os animais foram divididos em 4 grupos de tratamento: veículo, 70 mg/kg de NT157, 70mg/kg de imatinibe, 70mg/kg de NT157 combinado com 70mg/kg de imatinibe. O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. Os animais foram pesados no dia do transplante de células transduzidas com BCR-ABL1 (D0), no dia do início do tratamento (D17) e no dia da eutanásia (D22 pós-transplante). As variações do peso corporal entre o D0 e D22 (A) e entre D17 e D22 (B) estão ilustradas. A variação do peso corporal em percentagem é indicada no eixo y do gráfico. Não houve diferença estatística entre os grupos; one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 28. Curva de sobrevivência de animais transplantados com células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1 e tratados com veículo, NT157 e/ou imatinibe. Dezesete fêmeas receptoras foram injetadas com 5×10^5 células no dia 0 do transplante e randomizadas em 4 grupos de tratamento e monitoradas por até 45 dias pós transplante para análise de sobrevivência. O tratamento foi iniciado 17 dias pós-transplante: veículo (n=4), 70 mg/kg de NT157 (n=4), 70mg/kg de imatinibe (n=4), 70mg/kg de NT157 combinado com 70mg/kg de imatinibe (n=5). O NT157 e o veículo correspondente foram administrados via intraperitoneal, 3 vezes por semana, enquanto que o imatinibe foi administrado por gavagem, diariamente. A sobrevivência dos camundongos é ilustrada através das curvas de Kaplan Meier e comparadas usando Log-Rank; * $p=0,009$ comparado ao veículo. A mediana de sobrevivência para cada grupo está indicada para cada grupo de tratamento. O dia após transplante é indicado no eixo x e a percentagem de animais vivos é indicada no eixo y.

5. DISCUSSÃO

A rede de sinalização controlada pela oncoproteína BCR-ABL1 é complexa, altamente redundante e resulta no fenótipo de LMC, estando presente em 20-40% dos casos de LLA [22]. Apesar do aumento na identificação e da crescente complexidade das vias de sinalização ativadas por BCR-ABL1, todas as funções de transformação pelo BCR-ABL1 ainda dependem de sua atividade tirosinoquinase [158], que é especificamente inibida por inibidores tirosinoquinase, como o mesilato de imatinibe (Gleevec/Glivec, STI571). No entanto, o desenvolvimento de resistência aos inibidores tirosinoquinases, na sua maioria devido à aquisição de mutações no domínio quinase de BCR-ABL1, tem emergido como um desafio importante no tratamento da LMC [89, 159, 160]. Uma abordagem alternativa é o uso de outros compostos que não se ligam diretamente à proteína BCR-ABL1; em vez disso, estas moléculas atuam sobre outras proteínas que são reguladas por BCR-ABL1 e participariam da via de sinalização BCR-ABL1 e do processo de transformação maligna das células.

Na tentativa de elucidar novas vias de sinalização implicadas na fisiopatologia das neoplasias hematológicas, com possível impacto no prognóstico e na resposta terapêutica, nosso grupo de pesquisa tem utilizado uma estratégia investigativa de estudo de proteínas sabidamente implicadas em processos celulares de proliferação celular e metabolismo de células normais no contexto de neoplasias hematológicas. A presença de diferentes domínios em IRS1 e sua capacidade de interagir com diferentes proteínas motivou a investigação de uma possível interação proteica entre IRS1 e a oncoproteína BCR-ABL1.

Em 2003, nosso grupo de pesquisa foi pioneiro na identificação da fosforilação constitutiva de IRS1 e da associação de IRS1 com BCR-ABL1 em células K562, um modelo de LMC. O estudo descreveu a associação de IRS1 com PI3K e GRB2, e demonstrou que o tratamento com imatinibe resultou na diminuição tempo e dose-dependente da fosforilação de IRS1, sugerindo a formação de um complexo BCR-ABL1/IRS1/GRB2/PI3K. A fosforilação de IRS1 via BCR-ABL1 mantém a estabilidade do complexo, e o tratamento com imatinibe resultou em diminuição significativa da associação IRS1/PI3K e IRS1/GRB2, com consequente atenuação da atividade de PI3K e da via de sinalização MAPK [145].

Corroborando a participação das proteínas IRS1 nas vias de sinalização ativadas por BCR-ABL1, um estudo realizado por Juric e colaboradores em 2007 [144] observou, através de análises computacionais de dados obtidos de microarranjos de DNA, que a expressão de *IRS1* foi negativamente correlacionada com a sobrevida, independente da idade e da contagem de leucócitos no momento do diagnóstico, em pacientes com LLA BCR-ABL1 positivas. A

análise computacional de dados obtidos de microarranjos de DNA sugeriu um efeito antiapoptótico de IRS1 através da regulação positiva de BCL2 e da regulação negativa de FasL [144].

A participação funcional do IRS1 na via de sinalização BCR-ABL1 foi posteriormente comprovada através da avaliação do efeito do silenciamento de IRS1, mediado por lentivírus, em células K562. A inibição de IRS1 resultou em redução da proliferação celular e do crescimento clonal, acúmulo de células na fase G0/G1 e redução de células na fase S do ciclo celular, e inibição da fosforilação das proteínas AKT, P70S6K e ERK. Entretanto, a inibição de IRS1 não modulou a apoptose, as proteínas BCL2, BAX e BAD e a fosforilação de BCR-ABL1 e CRKL, e não apresentou sinergismo quando associado ao imatinibe [146].

Partindo da hipótese de que expressão aumentada de *IRS1* pudesse participar da fisiopatologia da doença, investigamos e comparamos a expressão gênica de *IRS1* em amostras de doadores normais e pacientes com LMC. Diferente do esperado, a expressão gênica de *IRS1*, mas não de *IRS2*, mostrou-se significativamente reduzida em pacientes com LMC comparados aos indivíduos saudáveis. Acreditamos que a expressão gênica de *IRS1* não reflete a ativação proteica; a expressão e ativação proteica de IRS1 e IRS2 na LMC precisa ser melhor investigada. A ativação constitutiva de IRS1 foi previamente descrita como evento frequente em câncer de mama, leiomioma, tumor de Wilms, rabdomiosarcoma, lipossarcoma, leiosarcoma e sarcoma adrenocortical [150]. Infelizmente, a obtenção de lisado celular adequado para *Western blot* e a indisponibilidade de anticorpo que avalie a proteína total ou fosforilada por citometria de fluxo limitam a avaliação da ativação proteica em amostras de células hematopoéticas primárias.

Baseados nos achados da participação de IRS1 no fenótipo neoplásico da célula BCR-ABL1⁺ [144-146], testamos o efeito de um inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2, NT157, na célula hematopoética normal e BCR-ABL1⁺. Os experimentos com células primárias revelaram que o tratamento com NT157 reduziu a formação de colônias de células mononucleares de pacientes com LMC, mas não de células de sangue de cordão umbilical de indivíduos saudáveis. Como demonstrado anteriormente, a ativação constitutiva de IRS1 em células K562 é dependente do BCR-ABL1 [145], e o aumento da expressão de IGF1R está associado à expressão do BCR-ABL1 em LMC [161]. As células obtidas do sangue de cordão umbilical de indivíduos saudáveis não possuem ativação constitutiva de IRS1 induzidas pela oncoproteína BCR-ABL1. Dessa forma, sugerimos que a inibição de IGF1R-IRS1/2 atue especificamente na redução da formação de colônias de células hematopoéticas BCR-ABL1⁺. A ausência de toxicidade do NT157 em células hematopoéticas primárias suporta o potencial

uso deste inibidor farmacológico para células BCR-ABL1⁺ e nos motivou a aprofundar a investigação dos efeitos antineoplásicos do composto NT157 em modelos celulares BCR-ABL1⁺.

Utilizando modelos de células leucêmicas humanas K562 BCR-ABL1⁺, observamos que o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2, NT157, reduziu viabilidade e proliferação celular e induziu apoptose, através da inibição da fosforilação de IGF1R, STAT3, STAT5, 4EBP1, P70S6K e ERK1/2, e da modulação de oncogenes e genes supressores tumorais.

A análise por PCR *array* indentificou que o tratamento de células K562 com 0,8 μ M de NT157 por 48 horas alterou a expressão de 71 genes das vias de sinalização envolvidas com o câncer em humanos, resultando em, no mínimo, o dobro ou a metade da expressão observada no controle não tratado. Dentre esses genes, confirmamos por PCRq a diminuição da expressão de *MYC* e do gene antiapoptótico *BCL2*. Em fibroblastos, IRS1 mostrou-se fundamental na translocação de β -Catenina para o núcleo e consequente transcrição de *MYC* [147]. Nosso grupo de pesquisa recentemente demonstrou que o eixo IRS1/ β -Catenina encontra-se ativado e induz a expressão de *MYC* em LLA [162]. A inibição de *BCL2* demonstrou ser estratégia terapêutica eficaz em tumores sólidos [163, 164] e LMC [165].

O aumento da expressão do inibidor de ciclo celular *CDKN1A* e dos fatores de transcrição *FOS* e *JUN* em células K562 tratadas com NT157 foram validados por PCRq. Apesar de a ativação de *FOS* e *JUN* estar relacionada à transformação maligna, o aumento da expressão dessas proteínas foi verificado em linhagem celular de câncer cervical HeLa após indução da apoptose por agentes alquilantes [166]. O ativador de transcrição *E2F1*, que apresentou-se diminuído após tratamento com NT157 no PCR *array*, mostrou-se aumentado na validação com iniciadores específicos. A proteína ambivalente parece exercer papel de oncogene e supressor tumoral [167, 168]. O aumento da expressão de *E2F1* verificado após dano ao DNA induzido por estresse celular e o fato de *E2F1* suprimir a expressão de *BCL2* [169] podem justificar o resultado obtido na validação com iniciadores específicos.

O presente trabalho verificou que a inibição específica de IRS1, mas não de IRS2, reduziu a viabilidade em células K562. Nosso grupo de pesquisa identificou previamente que a expressão de IRS2 encontra-se significativamente reduzida em pacientes com síndromes mielodisplásicas (SMD) comparados a indivíduos normais [125]. Em NMP BCR-ABL1 negativas, nosso grupo demonstrou previamente que IRS2 se associa a JAK^{V617F} e contribui para o aumento da viabilidade celular e redução da apoptose em células com mutação em JAK2 [126]. A análise de sequenciamento de segunda geração realizada por Savage e colaboradores identificou mutação em IRS2 em 13,6% (3/22) dos pacientes com LMC

resistentes ao imatinibe [127]. A expressão das duas mutações de IRS2 identificadas nos pacientes com LMC (S594W e H1328R) na linhagem celular Ba/F3 dependente de IL-3 resultou em aquisição de capacidade de sobrevivência na ausência de IL-3 e níveis variáveis de resistência ao imatinibe *in vitro* quando coexpressa com BCR-ABL1 [127]. Entretanto, a participação de IRS2 no fenótipo da célula BCR-ABL1 ainda precisa ser melhor investigada. Em NMP BCR-ABL1 negativas e triplo negativas para as mutações em JAK2, calreticulina e MPL, mutações em IRS2 foram detectadas em 12,5% (2/16) dos casos, mas estudos funcionais não foram realizados [170]. Posteriormente, a análise de 23 pacientes com LMC resistentes aos inibidores tirosinoquinase, através de mecanismo independente da atividade tirosinoquinase do BCR-ABL1, revelou mutação em IRS1 em 13% dos pacientes [171].

Durante a realização deste trabalho, esforços foram investidos na tentativa de verificar a associação de IRS2 e BCR-ABL1 através de transfecção de células K562 com vetor de expressão do IRS2 associado à *tag* e subsequente coimunoprecipitação, mas não alcançamos resultados conclusivos. Nossa hipótese é de que a expressão de IRS2 e IRS1 sejam controladas por mecanismo de *feedback*. Dessa maneira, quando IRS2 é silenciado, a indução compensatória da expressão/ativação de IRS1 explicaria o aumento na viabilidade, efeito oposto à inibição específica do IRS1. As evidências observadas até o momento [145, 146, 172] indicam que IRS1 participa do fenótipo neoplásico em células BCR-ABL1⁺ e IRS2 participa do fenótipo neoplásico de células JAK2^{V617F} positivas.

O presente estudo avaliou pela primeira vez os efeitos antineoplásicos exercidos pelo NT157 na proliferação celular através da avaliação de Ki-67. Esse antígeno é detectado durante todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas não é detectado em células durante a fase G0 [173]. A análise da marcação com anticorpo para citometria de fluxo anti-Ki-67 demonstrou que NT157 reduziu a proliferação em células K562, corroborando dados anteriores do nosso grupo que indicaram que o silenciamento de IRS1 reduziu a viabilidade celular sem apresentar efeito na apoptose [146].

O efeito do silenciamento de IRS1 na apoptose observada por Machado-Neto e colaboradores [146] difere do que verificamos no tratamento com NT157 e do que Zhao e colaboradores verificaram em estudo recente que verificou que o silenciamento através do uso de RNA de interferência (*short interference RNA* [siRNA]) de IRS1 e IRS2 reduziu a viabilidade e aumentou a apoptose em células K562 [174]. Destacamos 4 possíveis justificativas para as diferenças encontradas entre os estudos. (i) O NT157, diferente do shRNA ou siRNA, exerce efeito seletivo e não específico sobre as proteínas IRS, modulando também a expressão de outros genes e proteínas, como demonstrado na análise por PCR *array*

e *western blot*; (ii) A técnica de inibição através de shRNA depende de seleção dos clones inibidos utilizando-se antibiótico - o antibiótico de seleção pode não selecionar apenas as células inibidas, uma vez que determinados clones podem adquirir resistência, e os clones inibidos podem não sobreviver sem a presença do gene de interesse, apesar da resistência ao antibiótico; (iii) Zhao e colaboradores [174] avaliaram a apoptose em células silenciadas para IRS1 ou IRS2 em resposta celular à deprivação de soro e demonstraram que as células silenciadas para IRS1 ou IRS2 são mais sensíveis à deprivação de nutrientes comparadas às células controles; (iv) A metodologia de siRNA utilizada por Zhao e colaboradores difere do shRNA por ser transiente, conferindo inibição aguda da expressão do gene de interesse - nosso modelo experimental representa estratégia duradoura, com inibição crônica.

O tratamento com NT157 em células K562 resultou na redução da ativação de P70S6K e ERK1/2, além da redução na expressão de IRS1 e IRS2, de maneira semelhante à observada previamente através de silenciamento de IRS1 mediado por lentivírus [146], além de inibir a fosforilação de STAT3 e STAT5. A inibição da fosforilação das proteínas STAT verificada após tratamento com NT157 deve ocorrer de maneira independente da inibição de IRS1, como demonstrado pelo tratamento de linhagem celular de melanoma A375 com NT157 e subsequentemente com o inibidor de BRAF^{V600E} PLX-4032 [154]. O tratamento com o PLX-4032 inibiu ERK1/2 e preveniu a fosforilação de IRS1 em serina, impedindo a inibição do IRS1 pelo NT157. O tratamento combinado com ambos os compostos não inibiu IRS1, mas reduziu a fosforilação/ativação de STAT3, como observado na monoterapia com NT157. O NT157 ativou fosfatases que defosforilam o STAT3 no sítio de tirosina 705, indicando que as proteínas STAT parecem ser alvos diretos da ação do NT157 [154].

Adicionalmente, parece razoável que a interação do IRS1 com o receptor de hormônio do crescimento (GH) ative as vias JAK/STAT e MAPK [175]. O mecanismo pelo qual GH fosforila IRS1 ainda não foi esclarecido, mas parece estar associado à via JAK/STAT, uma vez que JAK2 é a única tirosinoquinase do receptor GH conhecida [143]. Foi verificado o aumento nos níveis de miR-21, p-IGF1R e p-JAK2 em células de carcinoma renal tratadas com IGF1 e o tratamento com NT157 foi capaz de reverter esses resultados [176]. Utilizando inibidor de JAK2 e STAT3, Su e colaboradores também verificaram que o aumento da expressão de miR-21 induzida por IGF1 foi revertido. O tratamento com IGF1 aumentou a sobrevivência e diminuiu apoptose em células de carcinoma renal, enquanto o tratamento com NT157 teve o efeito oposto [176]. A superexpressão de IGF1R verificada em LMC foi relacionada à expressão do BCR-ABL1 e induziu autorrenovação da célula-tronco da LMC [161], o IGF1R foi responsável pela manutenção da ativação de STAT5 [177], e o aumento da

expressão de STAT5 verificado em LMC esteve associado ao aparecimento de mutações no BCR-ABL1 [178]. Nosso estudo foi o primeiro a avaliar o efeito do NT157 em LMC e, enquanto estudos anteriores em outros modelos celulares verificaram somente inibição de STAT3 [151-154, 179], nossa análise verificou também a inibição de STAT5.

Tendo em vista o desenvolvimento de resistência aos inibidores tirosinoquinase nos pacientes com LMC, o uso do NT157 como composto que não se liga diretamente a proteína BCR-ABL1, exercendo seu efeito em outras proteínas que participam da via de sinalização do BCR-ABL1, representa abordagem alternativa no tratamento da doença. Neste contexto, avaliamos o efeito do NT157 em modelo de células BCR-ABL1 com ou sem a mutação T315I.

O tratamento das células Ba/F3 BCR-ABL1 e BCR-ABL1^{T315I} com NT157 diminuiu a viabilidade celular e aumentou a apoptose. O IC₅₀ de NT157 foi semelhante para as linhagens Ba/F3 BCR-ABL1 e Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}. Em ambas as células, o tratamento com NT157 inibiu a expressão de IRS1 e aumentou a fosforilação de IRS1 em seu resíduo inibitório serina 307, além de reduzir a ativação de ERK1/2. A redução na expressão de BCR-ABL1 foi verificada apenas na linhagem Ba/F3 BCR-ABL1, enquanto a redução da expressão de IRS2 foi verificada somente na linhagem Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}. Não foi possível, até o momento, obter resultados conclusivos quanto à ativação de 4EBP1, p70S6K e das proteínas STAT3 e STAT5 nestas células Ba/F3. Os resultados destacam que o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2 apresenta efeitos antineoplásicos em células BCR-ABL1 mesmo na presença da mutação T315I, e provavelmente este efeito antineoplásico da droga na célula com a mutação independe da inibição do BCR-ABL1.

Embora o tratamento com imatinibe exerça efeito satisfatório na maioria dos pacientes, a mutação T315I no domínio quinase do BCR-ABL1 confere resistência aos inibidores de tirosinoquinase imatinibe, dasatinibe, nilotinibe e bosutinibe. Recentemente, um novo inibidor de tirosinoquinase (ponatinibe) foi desenvolvido e demonstrou exercer efeito em células Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}, embora essas células sejam menos sensíveis ao tratamento do que as células Ba/F3 BCR/ABL1 [180]. O'Hare e colaboradores verificaram redução de 50% na fosforilação de Crkl em células BCR-ABL1^{T315I} em relação às células não tratadas, e redução de 90% na fosforilação de Crkl em células BCR-ABL1 tratadas com 10 nM de ponatinibe por 4 horas [180]. Após 48 horas, o tratamento com 0,8 µM de NT157 reduziu a viabilidade das células Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} em 65% e o IC₅₀ de NT157 indicou que, na ausência de IL3, as células Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} são mais sensíveis ao tratamento do que as células Ba/F3 BCR/ABL1 (0,3 µM *versus* 0,52 µM) [180].

Com o objetivo de validar o benefício do uso de NT157 em modelos *in vivo* de neoplasia BCR-ABL1^{T315I}, testamos o efeito do NT157 na proliferação de tumor no dorso de fêmeas BALB/c induzidos por células Ba/F3 BCR-ABL1 com ou sem a mutação T315I. Neste modelo, testamos o efeito da monoterapia com NT157 ou imatinibe e o efeito do tratamento combinado de NT157 e imatinibe, acreditando que ambas as drogas inibissem a proliferação do tumor induzidos por células Ba/F3 BCR-ABL1 e que apenas o uso isolado de NT157 inibisse a proliferação do tumor em células Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I}. Após 14 dias de tratamento, os animais começaram a apresentar ulceração na região do crescimento do tumor e precisaram ser eutanasiados. No dia da eutanásia, o NT157 e/ou imatinibe 50mg/kg não tiveram efeito na redução do tamanho dos tumores comparado ao veículo, em ambos os modelos celulares testados. O modelo alográfico de formação de tumor induzido por células Ba/F3 BCR-ABL1 e BCR-ABL1^{T315I} pode não ter sido eficiente, pois os tumores não atingiram sua fase de crescimento acelerado. No nosso experimento, observamos formação de tumor 3 dias após a injeção subcutânea das células, e o tratamento teve duração de 14 dias. Em experimentos conduzidos por O'Hare e colaboradores [181], 2×10^6 células Ba/F3 BCR-ABL1 ou Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} foram injetadas no subcutâneo de camundongos nude e um tumor de 100 mm³ foi observado 9 dias após a injeção das células, ocasião em que foi iniciado o tratamento com inibidores tirosinoquinase. O tratamento com imatinibe na dose de 50 mg/kg a cada 12 horas, intraperitoneal, durante 12 dias reduziu significativamente o crescimento do tumor induzido por células Ba/F3 BCR-ABL1, mas não reduziu o crescimento do tumor induzido por células Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} [181]. Dessa forma, interpretamos que o número de células injetadas e o fato de os animais apresentarem ulceração precoce (anterior ao crescimento acelerado dos tumores) inviabilizaram a avaliação do efeito do NT157 na inibição do tumor nos modelos testados. O resultado inesperado no experimento realizado não invalida a hipótese do trabalho e indica a necessidade de complementação do experimento com avaliação da ativação das proteínas alvo no tecido tumoral, a repetição dos experimentos com número maior de células injetadas e estudos de farmacocinética do NT157 em modelos animais para definir o melhor esquema terapêutico.

Estudos anteriores que investigaram os efeitos do tratamento com NT157 em modelos de tumor xenográfico testaram as doses NT157 100mg/kg e 70mg/kg três vezes por semana, intraperitoneal, em modelo de melanoma, verificando diminuição do tamanho do tumor e redução na infiltração de macrófagos em tumores induzidos por linhagem celular A375SM [151, 154]. A dose 70mg/kg administrada 3 vezes por semana intraperitoneal ou intravenoso foi avaliada em modelo animal de câncer de cólon esporádico e resultou em redução na

tumorigênese espontânea e crescimento tumoral [152]. Em câncer de próstata, a dose 50mg/kg administrada 3 vezes por semana intraperitoneal reduziu significativamente o tamanho dos tumores induzidos por linhagem celular LNCap [179]. Nenhum dos trabalhos mencionados reportou efeitos adversos devido ao tratamento com NT157.

Dando continuidade na avaliação do efeito do tratamento com NT157 em modelos de leucemia BCR-ABL1 *in vivo*, um outro modelo murino foi utilizado. A transdução das células dos camundongos doadores com o vetor Mig p210 para expressão do BCR-ABL1 é uma prática bem estabelecida no laboratório do Dr Brian Druker [182, 183]. Do ponto de vista metodológico, uma limitação do modelo é a agressividade da doença, que se assemelha mais à apresentação clínica de leucemia aguda. O acompanhamento da evolução da doença pode ser feito através da contagem de leucócitos. Essa contagem é realizada semanalmente devido ao limitado volume de sangue que pode ser retirado do animal com segurança. Após irradiação, os animais demoram cerca de 10 dias para reconstituição completa da medula óssea (observada por contagem hematimétrica dentro dos valores de referência). Infelizmente, a reconstituição medular é lenta e seguida pelo desenvolvimento agressivo da doença, sendo que o tempo viável de tratamento é curto. Dessa maneira, realizamos dois experimentos que diferiram no número de células do doador transplantadas no camundongo receptor e na dose das drogas utilizadas. No experimento 1, foram injetadas 4×10^5 células do doador, e os animais foram tratados com NT157 100mg/kg três vezes por semana e 100mg/kg/dia de imatinibe. No experimento 2, foram injetadas 5×10^5 células do doador e os animais foram tratados com doses de NT157 70mg/kg três vezes por semana e 70mg/kg/dia de imatinibe. No segundo experimento, tentamos acelerar a reconstituição hematopoética dos animais através de transplante com número maior de células do doador, mas o procedimento não acelerou a reconstituição hematopoética e resultou em doença ainda mais agressiva.

A utilização do gene reporter de expressão de GFP como controle da reconstituição medular também representa um desafio. Através desse marcador é possível acompanhar por citometria de fluxo a presença das células do animal doador no sangue periférico do animal receptor, mas não há como afirmar que essas células efetivamente expressam o oncogene BCR-ABL1. A inserção do gene de interesse e do gene reporter ocorre de maneira aleatória e é possível que ocorra de maneira independente.

No presente trabalho, no experimento 1, o tratamento combinado com NT157 100mg/kg, 3 vezes por semana, intraperitoneal e imatinibe 100mg/kg/dia por gavagem, no modelo animal de leucemia BCR-ABL1, resultou em significativa redução no tamanho do baço comparado ao grupo controle e comparado ao grupo que recebeu monoterapia com

NT157. Apenas o grupo tratado com imatinibe como monoterapia apresentou melhora significativa na sobrevida quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com NT157, o que indica a efetividade do modelo testado para o imatinibe. O grupo que recebeu tratamento combinado apresentou sobrevida não atingida comparada com os 27 dias de sobrevida do grupo controle e NT157, com valor de $p=0,09$; a falta de significância estatística pode ser decorrente do baixo número de animais incluídos para cada grupo de tratamento ($n=3$). O experimento não foi planejado para avaliação de possíveis efeitos tóxicos do NT157, mas observamos que os animais tratados com NT157 mostraram sinais de desidratação, irritabilidade e acúmulo de líquido abdominal. A avaliação da variação do peso corporal poderia indicar possível toxicidade do NT157, mas observamos que o tratamento combinado (NT157 e imatinibe) preveniu significativamente a perda de peso do animal entre o dia do início do tratamento e o dia da eutanásia, comparados aos animais tratados com veículo. Interpretamos que o NT157 não foi pior que o veículo e não impediu o efeito do imatinibe, e que o uso de NT157 combinado com imatinibe foi benéfico na prevenção da perda de peso corporal, possivelmente devido ao melhor controle da doença. Estudos anteriores testaram o tratamento com 100mg/kg de imatinibe 2 vezes ao dia, via oral, em modelo de LMC induzido por transplante de células hematopoéticas transduzidas com retrovírus contendo BCR-ABL1 [182], sem avaliar a variação do peso dos animais. No experimento 2, NT157 70mg/kg 3 vezes por semana combinado com imatinibe 70mg/kg/dia não foi suficiente para reduzir o tamanho do baço ou os parâmetros hematológicos, não modulou a variação do peso corporal de forma significativa, mas resultou no aumento da sobrevida dos animais de forma semelhante ao aumento da sobrevida induzido pela monoterapia com imatinibe. Os resultados indicam que o tratamento para o nosso modelo experimental precisa ser ajustado.

Os trabalhos anteriores de outros grupos de pesquisa [151, 152, 154, 179] guiaram nosso modelo experimental, mas vale ressaltar que estes estudos testaram os efeitos do NT157 em modelos de neoplasias sólidas. O modelo de LMC BCR-ABL1 representa um modelo particular de neoplasia, dependente de atividade tirosinoquinase do BCR-ABL1. Um nível sérico estável de NT157 deve ser necessário para inibir as vias de sinalização constitutivamente ativadas pela atividade tirosinoquinase do BCR-ABL1 no modelo testado, o que pode diferir dos modelos de tumores sólidos. O resultado inesperado no modelo animal não invalida a hipótese de que IRS1 seja uma proteína importante na via do BCR-ABL1 e que a inibição de IRS1 possa exercer efeitos antileucêmicos. Entretanto, novas estratégias de inibição, seja com diferentes esquemas terapêuticos de NT157 ou com diferentes inibidores farmacológicos, devem ser testados no futuro. Alternativamente, ajustes no modelo de

leucemia BCR-ABL1 podem auxiliar testes de novas drogas. O ajuste do número de células injetadas para obtenção de LMC pode resultar em modelo mais fiel ao da LMC em humanos. Para transpor as limitações da farmacocinética da droga testada e as limitações do modelo de leucemia BCR-ABL1 deste trabalho, iniciaremos estudos de transdução de células hematopoéticas de animais nocaute para *Irs1* e *Irs2* e transplante dessas células em animais receptores. Este modelo pode representar uma estratégia adequada para avaliação da participação da proteína IRS1 no desenvolvimento de neoplasia BCR-ABL1⁺.

A descrição recente de mutações nos genes que codificam as proteínas IRS1 e IRS2 em NMP [127, 170, 171] corrobora nossa hipótese de que as proteínas IRS representam importante alvo terapêutico para LMC e possivelmente para outras neoplasias hematológicas. Estudo recente identificou a presença de mutação com ganho de função IRS1^{P1201S} em leucemia de células pilosas; a expressão da mutação IRS1^{P1201S} em células Ba/F3 resultou em ativação da via PI3K/AKT/mTOR e fosforilação de ERK1/2, conferindo capacidade de proliferação independente de citocinas [184].

Os dados apresentados reforçam que IRS1 participa do fenótipo leucêmico BCR-ABL1 e o inibidor de IGF1R-IRS1/2 representa um potencial fármaco efetivo na LMC, especialmente em casos de resistência aos inibidores tirosinoquinase devido à mutação BCR-ABL1^{T315I}. A avaliação da eficácia do inibidor farmacológico NT157 em modelos animais de LMC exige ajustes nos modelos murinos utilizados no presente estudo, melhor entendimento da farmacocinética do composto e ajustes no esquema terapêutico utilizado.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

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

- A expressão gênica de *IRS1*, mas não de *IRS2*, encontra-se significativamente reduzida em amostras de medula óssea de pacientes com LMC comparada aos indivíduos saudáveis
- O tratamento com NT157 reduz a formação de colônias de células hematopoéticas de pacientes com LMC mas não de indivíduos saudáveis
- O tratamento com o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2, NT157, reduz viabilidade e proliferação celular e induz apoptose em células K562 BCR-ABL1⁺
- A avaliação dos efeitos do tratamento com NT157 na expressão gênica e na expressão/ativação proteica em células K562 possibilitou a identificação de múltiplos alvos da droga: inibição/ativação de IGF1R, IRS1, IRS2, STAT3, STAT5, 4EBP1, P70S6K e ERK1/2; aumento da expressão dos genes supressores de tumor *CDKN1A*, *FOS* e *JUN* e da redução dos oncogenes *MYC* e *BCL2*.
- Em células K562, a inibição específica de IRS1 através de lentivírus, mas não de IRS2, reduz a viabilidade celular
- Em células murinas Ba/F3 BCR-ABL1 e BCR-ABL1^{T315I}, o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2, NT157, induz apoptose e reduz ativação de ERK1/2 *in vitro*
- Na dose de 50mg/kg/dia, NT157 via intraperitoenal e/ou imatinibe falharam em reduzir o crescimento tumoral *in vivo* em modelo de tumor alográfico induzido por células Ba/F3 BCR-ABL1 e BCR-ABL1^{T315I}, nas condições testadas
- Em modelo animal de leucemia induzido por transplante de células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1, o tratamento com NT157 100mg/kg intraperitoneal, 3 vezes por semana, combinado com imatinibe 100mg/kg/dia por gavagem, reduziu significativamente o peso do baço, e preveniu a perda de peso comparado com veículo; apenas a monoterapia com imatinibe prolongou a sobrevida dos animais
- Em modelo animal de leucemia induzido por transplante de células hematopoéticas transduzidas com BCR-ABL1, o tratamento com NT157 70mg/kg intraperitoenal, 3 vezes por semana, e/ou imatinibe 70mg/kg/dia por gavagem não teve impacto no peso do baço e na variação do peso corporal; o tratamento com imatinibe em monoterapia ou combinado com NT157 prolongou a sobrevida dos animais

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
2. Kaushansky, K., *Lineage-specific hematopoietic growth factors*. N Engl J Med, 2006. **354**(19): p. 2034-45.
3. Nowell, P.C., *The minute chromosome (Phl) in chronic granulocytic leukemia*. Blut, 1962. **8**: p. 65-6.
4. Jabbour, E. and H. Kantarjian, *Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management*. Am J Hematol, 2014. **89**(5): p. 547-56.
5. Helman, R., et al., *Acute myeloid leukemia: update in diagnosis and treatment in Brazil*. Einstein (Sao Paulo), 2011. **9**(2): p. 179-83.
6. Jaffe E.S., H.N.L., Stein H., Vardiman J.W. (Eds.), *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, IARC: 2001.
7. Swerdlow S.H., C.E., Harris N.L. , et al. (Eds.), *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, IARC: 2001.
8. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
9. Goldman, J.M., *Chronic myeloid leukemia: a historical perspective*. Semin Hematol, 2010. **47**(4): p. 302-11.
10. Geary, C.G., *The story of chronic myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2000. **110**(1): p. 2-11.
11. Abelson, H.T. and L.S. Rabstein, *Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice*. Cancer Res, 1970. **30**(8): p. 2213-22.
12. De Klein, A., et al., *bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1986. **68**(6): p. 1369-75.
13. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
14. Groffen, J., et al., *Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22*. Cell, 1984. **36**(1): p. 93-9.
15. Goldman, J.M., et al., *Chronic myelogenous leukemia--the unfolding saga*. Leukemia, 1990. **4**(3): p. 163-7.
16. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, 1975. **45**(3): p. 321-34.
17. Konopka, J.B., S.M. Watanabe, and O.N. Witte, *An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity*. Cell, 1984. **37**(3): p. 1035-42.
18. Daley, G.Q., R.A. Van Etten, and D. Baltimore, *Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome*. Science, 1990. **247**(4944): p. 824-30.
19. Elefanty, A.G., I.K. Hariharan, and S. Cory, *bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice*. EMBO J, 1990. **9**(4): p. 1069-78.
20. Kelliher, M.A., et al., *Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6649-53.

21. Heisterkamp, N., et al., *Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice*. Nature, 1990. **344**(6263): p. 251-3.
22. Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, *The molecular biology of chronic myeloid leukemia*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3343-56.
23. Schwartzberg, P.L., et al., *Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations*. Cell, 1991. **65**(7): p. 1165-75.
24. Sawyers, C.L., et al., *The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth*. Cell, 1994. **77**(1): p. 121-31.
25. Denhardt, D.T., *Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling*. Biochem J, 1996. **318** (Pt 3): p. 729-47.
26. Wu, Y., J. Liu, and R.B. Arlinghaus, *Requirement of two specific tyrosine residues for the catalytic activity of Bcr serine/threonine kinase*. Oncogene, 1998. **16**(1): p. 141-6.
27. Ma, G., et al., *Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2*. Oncogene, 1997. **14**(19): p. 2367-72.
28. Liu, J., et al., *Inhibition of Bcr serine kinase by tyrosine phosphorylation*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 998-1005.
29. Goldman, J.M. and J.V. Melo, *Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment*. N Engl J Med, 2003. **349**(15): p. 1451-64.
30. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
31. Collins, M.K. and A. Lopez Rivas, *The control of apoptosis in mammalian cells*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(8): p. 307-9.
32. Ellis, R.E., J.Y. Yuan, and H.R. Horvitz, *Mechanisms and functions of cell death*. Annu Rev Cell Biol, 1991. **7**: p. 663-98.
33. Sachs, L. and J. Lotem, *Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy*. Blood, 1993. **82**(1): p. 15-21.
34. Laneuville, P., M. Timm, and A.T. Hudson, *bcr/abl expression in 32D cl3(G) cells inhibits apoptosis induced by protein tyrosine kinase inhibitors*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1360-6.
35. Pendergast, A.M., et al., *BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein*. Cell, 1993. **75**(1): p. 175-85.
36. Smetsers, T.F., et al., *Antisense BCR-ABL oligonucleotides induce apoptosis in the Philadelphia chromosome-positive cell line BV173*. Leukemia, 1994. **8**(1): p. 129-40.
37. Fisher, D.E., *Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold*. Cell, 1994. **78**(4): p. 539-42.
38. Korsmeyer, S.J., *Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 785-807.
39. Symonds, H., et al., *p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo*. Cell, 1994. **78**(4): p. 703-11.
40. Clarkson, B. and A. Strife, *Linkage of proliferative and maturational abnormalities in chronic myelogenous leukemia and relevance to treatment*. Leukemia, 1993. **7**(11): p. 1683-721.
41. Daley, G.Q. and D. Baltimore, *Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(23): p. 9312-6.
42. McGahon, A., et al., *BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death*. Blood, 1994. **83**(5): p. 1179-87.

43. Evan, G.I. and T.D. Littlewood, *The role of c-myc in cell growth*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(1): p. 44-9.
44. Askew, D.S., et al., *Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis*. Oncogene, 1991. **6**(10): p. 1915-22.
45. Askew, D.S., J.N. Ihle, and J.L. Cleveland, *Activation of apoptosis associated with enforced myc expression in myeloid progenitor cells is dominant to the suppression of apoptosis by interleukin-3 or erythropoietin*. Blood, 1993. **82**(7): p. 2079-87.
46. Evan, G.I., et al., *Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein*. Cell, 1992. **69**(1): p. 119-28.
47. Puil, L., et al., *Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway*. EMBO J, 1994. **13**(4): p. 764-73.
48. Afar, D.E., et al., *Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc*. Science, 1994. **264**(5157): p. 424-6.
49. Shtivelman, E., et al., *Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia*. Nature, 1985. **315**(6020): p. 550-4.
50. Melo, J.V., et al., *Expression of the ABL-BCR fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1993. **81**(10): p. 2488-91.
51. Keung, Y.K., et al., *Philadelphia chromosome positive myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia-retrospective study and review of literature*. Leuk Res, 2004. **28**(6): p. 579-86.
52. Ferreira, E., et al., *Bone marrow transplantation in Brazil*. Hum Immunol, 1985. **14**(3): p. 324-32.
53. Druker, B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 561-6.
54. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1031-7.
55. Kantarjian, H., et al., *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia*. N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 645-52.
56. Hochhaus, A., et al., *Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2017. **376**(10): p. 917-927.
57. Hamerschlak, N., et al., *Patients' perceptions about diagnosis and treatment of chronic myeloid leukemia: a cross-sectional study among Brazilian patients*. Sao Paulo Med J, 2015. **133**(6): p. 471-9.
58. Silveira, C.A., M.B. Daldegan, and I. Ferrari, *Response to treatment with imatinib mesylate in previously treated chronic-phase chronic myeloid leukemia patients in a hospital in Brazil*. Genet Mol Res, 2011. **10**(3): p. 2038-48.
59. Hamerschlak, N., et al., *Quality of life of chronic myeloid leukemia patients in Brazil: ability to work as a key factor*. Support Care Cancer, 2014. **22**(8): p. 2113-8.
60. Bhatia, R., et al., *Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4701-7.
61. O'Brien, S., et al., *NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myelogenous leukemia*. J Natl Compr Canc Netw, 2009. **7**(9): p. 984-1023.
62. Apperley, J.F., *Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia*. Lancet Oncol, 2007. **8**(11): p. 1018-29.
63. Peng, B., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients*. J Clin Oncol, 2004. **22**(5): p. 935-42.

64. Floyd, M.D., et al., *Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women*. Pharmacogenetics, 2003. **13**(10): p. 595-606.
65. Crossman, L.C., et al., *hOCT 1 and resistance to imatinib*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1133-4; author reply 1134.
66. Hughes, T.P., et al., *Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2003. **349**(15): p. 1423-32.
67. Merante, S., et al., *Outcome of four patients with chronic myeloid leukemia after imatinib mesylate discontinuation*. Haematologica, 2005. **90**(7): p. 979-81.
68. Rousselot, P., et al., *Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years*. Blood, 2007. **109**(1): p. 58-60.
69. Corbin, A.S., et al., *Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity*. J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 396-409.
70. Graham, S.M., et al., *Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro*. Blood, 2002. **99**(1): p. 319-25.
71. Tipping, A.J., et al., *Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistant chronic myeloid leukemia cells*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3864-7.
72. Barnes, D.J., et al., *Dose-dependent effects of Bcr-Abl in cell line models of different stages of chronic myeloid leukemia*. Oncogene, 2005. **24**(42): p. 6432-40.
73. O'Dwyer, M.E., et al., *The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1628-33.
74. O'Dwyer, M.E., et al., *Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate*. Blood, 2004. **103**(2): p. 451-5.
75. Cortes, J.E., et al., *Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3794-800.
76. Schoch, C., et al., *Occurrence of additional chromosome aberrations in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate*. Leukemia, 2003. **17**(2): p. 461-3.
77. Jabbour, E., et al., *Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate*. Leukemia, 2006. **20**(10): p. 1767-73.
78. Weisberg, E., et al., *Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 129-41.
79. O'Hare, T., et al., *In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4500-5.
80. Shah, N.P., et al., *Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor*. Science, 2004. **305**(5682): p. 399-401.
81. Cortes, J.E., et al., *A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias*. N Engl J Med, 2013. **369**(19): p. 1783-96.
82. Cortes, J.E., et al., *Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib*. Blood, 2011. **118**(17): p. 4567-76.

83. Roumiantsev, S., et al., *Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10700-5.
84. Gorre, M.E., et al., *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification*. Science, 2001. **293**(5531): p. 876-80.
85. Tokarski, J.S., et al., *The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5790-7.
86. Nagar, B., et al., *Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4236-43.
87. Nicolini, F.E., et al., *Epidemiologic study on survival of chronic myeloid leukemia and Ph(+) acute lymphoblastic leukemia patients with BCR-ABL T315I mutation*. Blood, 2009. **114**(26): p. 5271-8.
88. Zabriskie, M.S., et al., *BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia*. Cancer Cell, 2014. **26**(3): p. 428-42.
89. O'Hare, T., C.A. Eide, and M.W. Deininger, *Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2242-9.
90. Patti, M.E., et al., *4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24670-3.
91. Sun, X.J., et al., *Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein*. Nature, 1991. **352**(6330): p. 73-7.
92. Myers, M.G., Jr., et al., *IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase*. Endocrinology, 1993. **132**(4): p. 1421-30.
93. White, M.F., R. Maron, and C.R. Kahn, *Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells*. Nature, 1985. **318**(6042): p. 183-6.
94. Rothenberg, P.L., et al., *Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase*. J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8302-11.
95. Sun, X.J., et al., *Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22662-72.
96. Miralpeix, M., et al., *Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of multiple high molecular weight substrates in Fao hepatoma cells*. Biochemistry, 1992. **31**(37): p. 9031-9.
97. Wang, L.M., et al., *IL-4 activates a distinct signal transduction cascade from IL-3 in factor-dependent myeloid cells*. EMBO J, 1992. **11**(13): p. 4899-908.
98. Wang, L.M., et al., *Common elements in interleukin 4 and insulin signaling pathways in factor-dependent hematopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4032-6.
99. Sun, X.J., et al., *Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling*. Nature, 1995. **377**(6545): p. 173-7.
100. Sun, X.J., et al., *The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(2): p. 251-62.
101. Araki, E., et al., *Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1. Characterization of the cDNA, gene, and chromosomal localization*. Diabetes, 1993. **42**(7): p. 1041-54.

102. Lavan, B.E., W.S. Lane, and G.E. Lienhard, *The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11439-43.
103. Smith-Hall, J., et al., *The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells*. Biochemistry, 1997. **36**(27): p. 8304-10.
104. Lavan, B.E., et al., *A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21403-7.
105. Holgado-Madruga, M., et al., *A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling*. Nature, 1996. **379**(6565): p. 560-4.
106. Moodie, S.A., J. Alleman-Sposeto, and T.A. Gustafson, *Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 11186-93.
107. Kaburagi, Y., et al., *The role of the NPXY motif in the insulin receptor in tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and Shc*. Endocrinology, 1995. **136**(8): p. 3437-43.
108. Sasaoka, T., et al., *Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13689-94.
109. Ribon, V. and A.R. Saltiel, *Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem J, 1997. **324** (Pt 3): p. 839-45.
110. Chen, J., et al., *Stat5 is a physiological substrate of the insulin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2295-300.
111. Yenush, L., et al., *The pleckstrin homology domain is the principal link between the insulin receptor and IRS-1*. J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 24300-6.
112. Sawka-Verhelle, D., et al., *Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 5980-3.
113. Sun, X.J., et al., *Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(12): p. 7418-28.
114. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9047-54.
115. Hirosumi, J., et al., *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-6.
116. Carlson, C.J., M.F. White, and C.M. Rondinone, *Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(2): p. 533-9.
117. Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel, and J.F. Tanti, *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 99-109.
118. Jaeschke, A. and R.J. Davis, *Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases*. Mol Cell, 2007. **27**(3): p. 498-508.
119. Ozcan, U., et al., *Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1137-40.
120. Rui, L., et al., *Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways*. J Clin Invest, 2001. **107**(2): p. 181-9.

121. Solinas, G., et al., *Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16454-9.
122. Verdier, F., et al., *Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26173-8.
123. Miyakawa, Y., et al., *Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2494-502.
124. Schacher, D.H., et al., *Developmental expression of insulin receptor substrate-2 during dimethylsulfoxide-induced differentiation of human HL-60 cells*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 113-20.
125. Machado-Neto, J.A., et al., *Downregulation of IRS2 in myelodysplastic syndrome: a possible role in impaired hematopoietic cell differentiation*. Leuk Res, 2012. **36**(7): p. 931-5.
126. de Melo Campos, P., et al., *IRS2 silencing increases apoptosis and potentiates the effects of ruxolitinib in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms*. Oncotarget, 2016.
127. Savage, S.L., et al., *Activating Mutations of Insulin Receptor Substrate 2 (IRS2) in Patients with Tyrosine Kinase Inhibitor-Refractory Chronic Myeloid Leukemia*. Blood, 2015. **126**(23): p. 2461-2461.
128. Ullrich, A., et al., *Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity*. EMBO J, 1986. **5**(10): p. 2503-12.
129. Baserga, R., et al., *The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1332**(3): p. F105-26.
130. Shimon, I. and O. Shpilberg, *The insulin-like growth factor system in regulation of normal and malignant hematopoiesis*. Leuk Res, 1995. **19**(4): p. 233-40.
131. Frostad, S., et al., *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) has a costimulatory effect on proliferation of committed progenitors derived from human umbilical cord CD34+ cells*. Stem Cells, 1998. **16**(5): p. 334-42.
132. Chapuis, N., et al., *Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody*. Haematologica, 2010. **95**(3): p. 415-23.
133. Yaktapour, N., et al., *Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) as a novel target in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2013. **122**(9): p. 1621-33.
134. Kaushansky, K., *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3339-47.
135. Kimura, S., et al., *Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1195-200.
136. Qian, H., et al., *Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(6): p. 671-84.
137. Yoshihara, H., et al., *Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(6): p. 685-97.
138. Geddis, A.E., *Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **57**(2): p. 199-203.
139. Alexander, W.S., et al., *Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2162-70.

140. Walne, A.J., et al., *Exome sequencing identifies MPL as a causative gene in familial aplastic anemia*. Haematologica, 2012. **97**(4): p. 524-8.
141. Myers, M.G., Jr. and M.F. White, *The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains*. Diabetes, 1993. **42**(5): p. 643-50.
142. Senthil, D., et al., *The type 2 vascular endothelial growth factor receptor recruits insulin receptor substrate-1 in its signalling pathway*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 1): p. 49-56.
143. Ridderstrale, M., E. Degerman, and H. Tornqvist, *Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(8): p. 3471-4.
144. Juric, D., et al., *Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias*. J Clin Oncol, 2007. **25**(11): p. 1341-9.
145. Traina, F., et al., *BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells*. FEBS Lett, 2003. **535**(1-3): p. 17-22.
146. Machado-Neto, J.A., et al., *Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(8): p. 1404-11.
147. DeAngelis, T., et al., *Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signaling*. Oncogene, 2006. **25**(1): p. 32-42.
148. Wang, L.M., et al., *IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells*. Science, 1993. **261**(5128): p. 1591-4.
149. Tanaka, S. and J.R. Wands, *A carboxy-terminal truncated insulin receptor substrate-1 dominant negative protein reverses the human hepatocellular carcinoma malignant phenotype*. J Clin Invest, 1996. **98**(9): p. 2100-8.
150. Chang, Q., et al., *Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6035-8.
151. Reuveni, H., et al., *Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment*. Cancer Res, 2013. **73**(14): p. 4383-94.
152. Sanchez-Lopez, E., et al., *Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling*. Oncogene, 2016. **35**(20): p. 2634-44.
153. Garofalo, C., et al., *Preclinical Effectiveness of Selective Inhibitor of IRS-1/2 NT157 in Osteosarcoma Cell Lines*. Front Endocrinol (Lausanne), 2015. **6**: p. 74.
154. Flashner-Abramson, E., et al., *Targeting melanoma with NT157 by blocking Stat3 and IGF1R signaling*. Oncogene, 2016. **35**(20): p. 2675-80.
155. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
156. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
157. Warmuth, M., et al., *Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery*. Curr Opin Oncol, 2007. **19**(1): p. 55-60.
158. Druker, B.J., et al., *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1038-42.

159. Hughes, T.P., et al., *BCR-ABL1* mutation development during first-line treatment with dasatinib or imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*, 2015. **29**(9): p. 1832-8.
160. Apperley, J.F., *Chronic myeloid leukaemia*. *Lancet*, 2015. **385**(9976): p. 1447-59.
161. Lakshmikuttyamma, A., et al., *Bcr-Abl* induces autocrine IGF-1 signaling. *Oncogene*, 2008. **27**(27): p. 3831-44.
162. Fernandes, J.C., et al., *IRS1/beta-Catenin Axis Is Activated and Induces MYC Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells*. *J Cell Biochem*, 2017. **118**(7): p. 1774-1781.
163. Oltersdorf, T., et al., *An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours*. *Nature*, 2005. **435**(7042): p. 677-81.
164. Vartak, S.V., et al., *A novel inhibitor of BCL2, Disarib abrogates tumor growth while sparing platelets, by activating intrinsic pathway of apoptosis*. *Biochem Pharmacol*, 2016. **122**: p. 10-22.
165. Ko, T.K., et al., *The BCL2 inhibitor ABT-199 significantly enhances imatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia progenitors*. *Oncotarget*, 2014. **5**(19): p. 9033-8.
166. Kumari, S.R. and R. Alvarez-Gonzalez, *Expression of c-jun and c-fos in apoptotic cells after DNA damage*. *Cancer Invest*, 2000. **18**(8): p. 715-21.
167. Stanelle, J. and B.M. Putzer, *E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics*. *Trends Mol Med*, 2006. **12**(4): p. 177-85.
168. Johnson, D.G. and J. Degregori, *Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context*. *Curr Mol Med*, 2006. **6**(7): p. 731-8.
169. Eischen, C.M., et al., *Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1*. *Oncogene*, 2001. **20**(48): p. 6983-93.
170. Chang, Y.C., et al., *Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms*. *Med Oncol*, 2017. **34**(5): p. 83.
171. Eide, C.A., et al., *Characterization of the Genomic Landscape of BCR-ABL1 Kinase-Independent Mechanisms of Resistance to ABL1 Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia*. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 1119-1119.
172. de Melo Campos, P., et al., *IRS2 silencing increases apoptosis and potentiates the effects of ruxolitinib in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms*. *Oncotarget*, 2016. **7**(6): p. 6948-59.
173. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
174. Zhao, H., et al., *MiR-570 inhibits cell proliferation and glucose metabolism by targeting IRS1 and IRS2 in human chronic myelogenous leukemia*. *Iran J Basic Med Sci*, 2017. **20**(5): p. 481-488.
175. Winston, L.A. and T. Hunter, *JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(52): p. 30837-40.
176. Su, Y., et al., *The IGF-I/JAK2-STAT3/miR-21 signaling pathway may be associated with human renal cell carcinoma cell growth*. *Cancer Biomark*, 2017. **19**(3): p. 289-296.
177. Gan, Y., et al., *IGF-1R modulation of acute GH-induced STAT5 signaling: role of protein tyrosine phosphatase activity*. *Mol Endocrinol*, 2013. **27**(11): p. 1969-79.
178. Warsch, W., et al., *STAT5 triggers BCR-ABL1 mutation by mediating ROS production in chronic myeloid leukaemia*. *Oncotarget*, 2012. **3**(12): p. 1669-87.

179. Ibuki, N., et al., *The tyrphostin NT157 suppresses insulin receptor substrates and augments therapeutic response of prostate cancer*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(12): p. 2827-39.
 180. O'Hare, T., et al., *AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance*. Cancer Cell, 2009. **16**(5): p. 401-12.
 181. O'Hare, T., et al., *SGX393 inhibits the CML mutant Bcr-AblT315I and preempts in vitro resistance when combined with nilotinib or dasatinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5507-12.
 182. Agarwal, A., et al., *Effects of plerixafor in combination with BCR-ABL kinase inhibition in a murine model of CML*. Blood, 2012. **120**(13): p. 2658-68.
 183. Agarwal, A., et al., *Absence of SKP2 expression attenuates BCR-ABL-induced myeloproliferative disease*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1960-70.
 184. Durham, B.H., et al., *Genomic analysis of hairy cell leukemia identifies novel recurrent genetic alterations*. Blood, 2017.
-

8. ANEXOS

ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do efeito do silenciamento do IRS1/IRS2 no fenótipo de células hematopoiéticas primárias normais CD34+ e leucêmicas BCR-ABL+

Pesquisador: Renata Scopim Ribeiro

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 54588416.0.0000.5440

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.768.738

Apresentação do Projeto:

A hematopoiese é regulada por citocinas e fatores de crescimento. A ação adequada das citocinas e dos fatores de crescimento depende, entre outros fatores, da ação de proteínas adaptadoras citoplasmáticas, como os substratos do receptor de insulina (IRS). A associação das proteínas IRS a seus receptores resulta na fosforilação do IRS em seus resíduos de tirosina na porção C-terminal, gerando sítios de ligação que recrutam proteínas efetoras que participam da sinalização celular das vias PI3K/AKT e MAP kinase. Os principais receptores capazes de ativar IRS1 e IRS2 são os receptores de insulina (IR) e IGF1 (IGF1R). Adicionalmente, o IRS2 pode ser ativado a partir da sua associação com os receptores de eritropoetina (EPOR) e trombopoetina (MPL) e o IRS1 pode ser ativado pela oncoproteína citoplasmática BCR-ABL. Apesar das vias PI3K/AKT e MAP kinase serem recrutadas na hematopoiese normal e desreguladas em neoplasias hematológicas a participação das proteínas IRS na ativação destas vias de sinalização na hematopoiese normal e leucêmica tem sido pouco estudada. O objetivo desse estudo é investigar o fenótipo das células hematopoiéticas normais CD34+ e células leucêmicas primárias BCR-ABL+ após o silenciamento de IRS1 e IRS2. Células hematopoiéticas normais CD34+ e de pacientes com diagnóstico de LMC silenciadas através da metodologia de lentivírus ou tratadas com NT157 (inibidor IRS1/IRS2) serão submetidas a estudos funcionais de diferenciação, e/ou proliferação e apoptose celular. A modulação da via

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

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

Continuação do Parecer: 1.768.738

PI3K/AKT/mTOR e

MAP kinase nas células silenciadas ou não para IRS1/IRS2 será avaliada através de Western Blotting.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a participação do IRS2 nos processos de diferenciação e sobrevivência das células hematopoiéticas • Investigar o efeito do silenciamento do IRS2 nos processos de diferenciação eritrocítica, granulocítica e megacariocítica em modelos de linhagem leucêmica • Investigar o efeito do silenciamento do IRS2 nos processos de diferenciação (eritrocítica, granulocítica e megacariocítica), proliferação e apoptose celular em

células hematopoiéticas normais CD34+ • Em células hematopoiéticas normais CD34+, avaliar o efeito do tratamento com NT157 (inibidor IRS1/IRS2) na proliferação e apoptose celular • Investigar a participação das proteínas IRS1/IRS2 no fenótipo da célula leucêmica BCR-ABL+ • Investigar e comparar a expressão gênica de IRS1 e IRS2 em amostras de medula óssea de indivíduos normais e de pacientes com diagnóstico de LMC • Investigar o efeito do silenciamento do IRS1 nos processos de proliferação e apoptose celular em células CD34+ de pacientes com diagnóstico de LMC • Em linhagens leucêmicas BCR-ABL+, avaliar o efeito do tratamento com NT157 (inibidor IRS1/IRS2) na ativação da via PI3K/AKT e MAP kinase, na proliferação e apoptose celular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco é mínimo e está relacionado à coleta de medula óssea. O desconforto que você pode sentir é apenas da picada da agulha durante a coleta e um potencial hematoma que possa se formar no local da picada da agulha. Infecção no local da coleta pode acontecer muito raramente. Todas as informações obtidas nos testes realizados serão mantidas em sigilo e apenas os pesquisadores responsáveis terão acesso à sua amostra guardada no freezer, às informações obtidas e à identificação da sua amostra de sangue. As amostras guardadas no freezer serão numeradas e não conterão nenhuma informação que possa identificar o doador.

Benefícios:

É muito pouco provável que o que nós aprendermos com este estudo tenha um benefício direto para você. Estes resultados poderão ser úteis para o tratamento de pacientes no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Casuística: Células hematopoiéticas normais serão obtidas de doadores de medula óssea (18 anos de idade) (4mL) para transplante de medula óssea alogênico aparentado. Prevemos a inclusão de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

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

Continuação do Parecer: 1.768.738

30 amostras de indivíduos. Amostras de medula óssea (4mL) serão coletadas, prospectivamente, de pacientes com LMC 18 anos atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMRP-USP), no momento do diagnóstico da doença e após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Prevemos a inclusão de 50 pacientes com diagnóstico de LMC. Linhagens celulares: As linhagens celulares KU812, K562 e NB4 serão utilizadas. Tratamento com NT157: O NT157 será diluído em DMSO e diferentes concentrações e tempo de cultura serão testados em células hematopoiéticas CD34+ normais e células BCR-ABL+ para se definir o IC50 e o tempo ideal de cultura. Transdução de lentivírus: Para produção de vírus será utilizado o sistema de expressão BLOCK-it Lentiviral RNAi Expression System de acordo com instruções do fabricante. PCR quantitativo (PCRq): Amplificação por qPCR será realizada no ABI 5700 Sequence Detector System utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix, de acordo com instruções do fabricante. Western Blotting: Após extração proteica, as amostras serão submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE, que após a transferência, a membrana resultante será realizada submetida a ligação de anticorpos primários e secundários específicos. Estudos da proliferação celular: Células hematopoiéticas normais CD34+, células leucêmicas BCR-ABL+ e linhagens celulares BCR-ABL+ submetidas à transdução por lentivírus para inibição de IRS1 ou de IRS2, e células submetidas ao tratamento com NT157 serão submetidas a estudos de proliferação celular conforme detalhado a seguir: Avaliação de Proliferação: A proliferação celular será avaliada no CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Avaliação do crescimento clonal: O crescimento clonal será avaliado através da formação de colônias. Estudos do ciclo celular: Células serão fixadas com etanol 70%, centrifugadas e ressuspendidas em PBS com 10% de triton, 10µg/mL de iodeto de propídeo e 100g/mL de RNase A, incubadas por 15 minutos à 37°C no escuro e o ciclo celular será avaliado por citometria de fluxo e a análise com o programa Cell Quest. Estudos da apoptose celular, Marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo: O estudo da apoptose será realizado através da marcação das células com anexina V e Iodeto de Propídeo por citometria de fluxo. Diferenciação de linhagens celulares: Células KU812, NB4 e K562 serão submetidas a transdução lentiviral para silenciamento do IRS2 (shIRS2) ou controle (shControl). Células KU812 serão induzidas à diferenciação eritroide através do tratamento com 50µL de hemina e 100 µL de hidroxiuréia por 4 dias. Células NB4 serão induzidas à diferenciação granulocítica através do tratamento com 106 µL ATRA por 4. Células K562 serão induzidas à diferenciação megacariocítica através do tratamento com 20 nM PMA. Diferenciação de células CD34+: Para separação de progenitores CD34++, células mononucleares

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

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

Continuação do Parecer: 1.768.738

de medula óssea serão isoladas em gradiente de Ficoll-Hypaque e separadas através de colunas de imunoafinidade MIDI-MACS, de acordo com as instruções do fabricante e diferenciação eritrocítica com EPO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram corrigidos conforme parecer emitido anteriormente pelo CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, Projeto de pesquisa Versão 2 – 21 de julho de 2016 assim como seu Biorrepositório, Termos de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 – 21 de julho de 2016 e TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO Versão 3 – 4 de outubro de 2016 aprovados.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_652731.pdf	04/10/2016 16:19:12		Aceito
Declaração de Pesquisadores	RespostaCEP_041016.pdf	04/10/2016 16:18:44	Fabiola Traina	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoMaterialBiologico_LMC_041016.pdf	04/10/2016 16:17:26	Fabiola Traina	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_LMC_21072016.doc	21/07/2016 14:55:14	Fabiola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_normais_21072016.doc	21/07/2016 14:54:58	Fabiola Traina	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

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

Continuação do Parecer: 1.768.738

Justificativa de Ausência	TCLE_normais_21072016.doc	21/07/2016 14:54:58	Fabiola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LMC_21072016.doc	21/07/2016 14:54:05	Fabiola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCGuardaMaterialBiologico_LMC_240516.pdf	24/05/2016 15:32:54	Fabiola Traina	Aceito
Outros	RespostaCEP_16052016.pdf	17/05/2016 19:08:50	Fabiola Traina	Aceito
Outros	Aprovacao_orcamento.PDF	29/03/2016 12:38:17	Fabiola Traina	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Carta_encaminhamento_biorepositorio.PDF	29/03/2016 12:37:21	Fabiola Traina	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	22/03/2016 17:20:20	Fabiola Traina	Aceito
Orçamento	Orcamento_LMC_16022016.pdf	17/02/2016 10:07:58	Fabiola Traina	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 06 de Outubro de 2016

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO B

PARECER CONSUBSTANCIADO DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 02/02/12
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1209/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1110.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "BIOLOGIA DAS DOENÇAS NEOPLÁSICAS DA MEDULA ÓSSEA".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Teresinha Olalla Saad
INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/11/2011
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 02/02/13 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Investigar os fatores envolvidos na auto-renovação e manutenção de células neoplásicas da medula óssea, a saber, as mielodisplasias, as leucemias agudas, mielóide linfóide, e o mieloma múltiplo.

III – SUMÁRIO.

Trata-se de projeto temático que visa investigar os mecanismos moleculares das interações, mudanças epigenéticas e caracterização funcional de proteínas envolvidas na patogênese de células neoplásicas que ocorrem no microambiente da medula óssea e regulam a diferenciação, proliferação e sobrevivência destas células. A estratégia de investigação envolve modelos *in vitro*, implantação de modelos em animais, ensaios funcionais, validação de resultados em coortes de pacientes, entre outros. É composto pelos "sub-projetos" assim intitulados: Nicho e auto-renovação; autofagia como alvo em malignidades hematopoiéticas; Novos ativos; Investigação de vias desreguladas em mielodisplasia, leucemias agudas e mieloma múltiplo a partir de resultados prévios obtidos em microarrays; Sequenciamento de última geração para investigação de casos selecionados; Imunomodulação; Caracterização estrutural de proteínas envolvidas em vias de sinalização celular de neoplasias hematológicas. O projeto inclui na inscrição das estratégias o item "Pacientes", no qual consta: "Este projeto foi submetido para apreciação do comitê de ética e aguarda parecer". Nestes itens informa-se que serão realizadas coletas de medula junto às coletas de rotina, para análise morfológica e de cariótipo. Além disto, serão obtidas medulas ósseas de controles normais, por ocasião da coleta de doação de doadores de medula óssea. Entre os pacientes, serão convidados aqueles com diagnóstico preciso de mielodisplasia e que estejam em acompanhamento por pelo menos 6 meses. A coleta (pacientes ou controles) será de 5 mL de medula, visando 1) extração de mRNA, 2) citometria de fluxo, 3) seleção de células CD34+, 4) co-cultivo com células estromais, 5) tratamento *in vitro* de células em suspensão com os agentes terapêuticos, 6) tratamento *in vitro* com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais, 7) transplante xenogênico, 8) extração de DNA para investigação das mutações em casos selecionados. Não há informação do número de doadores previstos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO C

CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMITÊ INSTITUCIONAL DE BIOSEGURANÇA (*INSTITUTIONAL BIOSAFETY COMMITTEE*) DA *OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY*

June 12, 2017

Brian J. Druker, MD
Professor
Center for Hematologic Malignancies
Oregon Health & Science University

Dear Dr. Druker:

This letter is to notify you that the Institutional Biosafety Committee has reviewed and approved your protocol, "*Chronic Myelogenous Leukemia and BCR-ABL Substrates*", IBC registration number: IBC-02-40.

Please note that this approval is for the described experiments only. Your approval date for this project is June 12, 2017. **Annual review and approval is required for continued work on this project and the last day of continuing review period is one year from approval date.**

Reminder:

For any changes to this project during the year, including most new gene inserts, you must submit a protocol amendment if the changes are not pre-approved (see <http://www.ohsu.edu/xd/about/services/integrity/policies/ibc-policies.cfm>).

Please note the following ongoing requirements:

Biosafety Level:

- **Please note:** Your laboratory has been issued IBC approval to work with biological agents at both BSL2 and BSL2+ in the same laboratory area, therefore **BSL2+** practices and PPE must be used for **all** biological experiments in that area while the BSL2+ work is active. Please contact the biosafety officer if you have questions.
- **Lentiviral vectors are risk group III agents.** Transfection of viral constructs, production of virus, viral infection of cells, and injection into animals should take place using Biosafety Level 2 (BSL-2) containment and practices.
 - Transfection of lentiviral constructs, production of virus, viral infection of cells and injection into animals should take place using **BSL-2+ containment and practices for inserts with oncogenic potential.**
- In vivo use of lentivirus:**
 - For murine cells transduced with lentivirus:
After injection of animals, the injection site should be cleansed with 70% ethanol and then animals should be placed into a secondary container without bedding. Once the injection site is dry, animals can be returned to original cage(s) and returned to the ABSL-1 animal facility. The secondary container should also be cleaned with 70% ethanol.
 - For use of human cells transduced with lentivirus:

Institutional Biosafety Committee
OHSU Research Integrity Office

tel 503 494-7887, option 1
ibc@ohsu.edu

- ABSL-2 housing is required. **Please note that ABSL-2 space is limited. Please contact DCM at least two weeks in advance via the Hazardous Notification email DCMHazardNotify@ohsu.edu or call the DCM office to assure that all personnel are properly trained and that appropriate space is available for the required containment.**
- **Baculovirus and murine retrovirus produced with ecotropic packaging cells are Risk Group I agents.** Work should be conducted using Biosafety Level 1 (BSL-1) containment and practices (standard microbiological practices).
 - Work with human cells should take place using Biosafety Level 2 (BSL-2) containment and practices.

In vivo work with murine retrovirus produced with ecotropic packaging cells:

- Although animals may be housed in ABSL-1 containment, the following additional practices should be used for work with animals injected with recombinant virus:
 - Injected animals should be handled last if checking on multiple cages
 - Gloves should be changed after handling injected animals
 - Cages must be clearly labeled with the experimental agent
 - The Department of Comparative Medicine must be notified well in advance of bringing injected animals into an ABSL-1 room.**

Principal Investigator Responsibilities:

- All investigators should read CDC and NIH Guidelines (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories; see <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>) for information regarding the containment and practices for the laboratory and animal biosafety levels required for this work. If you need any clarification on the standard Biosafety Level requirements, please contact the Biosafety Officer.
- **Use of potentially oncogenic/toxic genes in viral vectors carries the risk of infecting humans with a potentially hazardous recombinant virus.** Laboratory personnel should be informed of this risk. As stated in the CDC and NIH Guidelines, the Principal Investigator is responsible for making certain that all laboratory staff and support personnel are properly trained in the practices and techniques required to ensure safety, and to supervise the performance of those involved to ensure that the required safety practices and techniques are employed. Please contact the Biosafety Officer if you need assistance with this training.
- All investigators should read the IBC policy on Research Accidents and Spills http://www.ohsu.edu/xd/about/services/integrity/policies/upload/IBC-EHRS-Policy_Research-Accidents-and-Spills.pdf which outlines the requirements for exposure and spill response. Detailed laboratory procedures should be included in laboratory biosafety manuals.
- For other Principal Investigator responsibilities during the conduct of research using recombinant DNA molecules, please read: http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/resources/InvestigatorEducationalBrochureRecombinant%20DNA_0.pdf

Shipping and Transport:

- Procedures for shipment of biological materials must meet all DOT, IATA and CITES requirements. Dangerous Goods shipping training is required for all individuals who will be shipping biological materials and is now available on Compass (<https://ohsu.csod.com>). Please

Institutional Biosafety Committee
OHSU Research Integrity Office

tel 503 494-7887, option 1
ibc@ohsu.edu

note that private transportation of biological specimens on public roadways must be in compliance with DOT packaging requirements.

NIH Guidelines Category

- Baculovirus is covered by Section III-E of the NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules, as described at http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/NIH_Guidelines.html#_Toc351276244
- All other research is covered by Section III-D of the NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules, as described at http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/NIH_Guidelines.html#_Toc351276236.

Lastly, the IBC reserves the right to review your biosafety precautions with respect to this project at any time. If you have any questions or concerns about these requirements, please do not hesitate to contact the IBC office or the Biosafety Officer for assistance.

Sincerely,

The OHSU IBC Office

ANEXO D

PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROTOCOLO “CML AND BCR-ABL SUBSTRATES” APROVADO PELO INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)

View: IACUC Prot

[<< Back](#)
[Exit](#) | [Hide/Show Errors](#) | [Print...](#) | Jump To: [Protocol Identification](#)

Protocol Identification

1.0 * Protocol Title:
CML and Bcr-Abl Substrates

2.0 * Protocol Type:
[Initial](#)

3.0 * Application Type:
Research

4.0 * Campus:
[Central and Waterfront Campus](#)

5.0 * Principal Investigator:
Brian Druker

6.0 Protocol Coordinator:
Kara Johnson Or Select: Same as PI: ☐

7.0 Protocol Staff:

Name	Work Phone	Email	Fax
Theodore Braun	503-494-8725	braunt@ohsu.edu	503-494-1552
Cody Coblenz		coblenz@ohsu.edu	
Isabel English		englishi@ohsu.edu	
Nathalie Javidi-Sharifi		javidish@ohsu.edu	
Chelsea Jenkins		chjenkins@hotmail.com	
Jacqueline Martinez	956-543-6293	martjacq@ohsu.edu	
Renata Ribeiro	SM.Knight Cancer Institute	scopimri@ohsu.edu	
Elie Traer	503-494-3553	traere@ohsu.edu	503-494-1552

8.0 * Emergency Contacts:

Name	Work Phone	Cell Phone	Email
Theodore Braun	503-494-8725	503-351-9348	braunt@ohsu.edu
Elie Traer	503-494-3553	203-560-3564	traere@ohsu.edu

9. APÊNDICE

APÊNDICE

TABELA SUPLEMENTAR: ONCOGENES E GENES SUPRESSORES TUMORAIS HUMANOS AVALIADOS POR PCR ARRAY

Genes	FC	Genes	FC	Genes	FC	Genes	FC	Genes	FC
CCND1	0,1100	NFKB1	0,6724	ITGB1	1,0794	FOXO1	1,6156	TEK	4,0200
MYC	0,2061	PAK1	0,6753	HSPB1	1,0975	APAF1	1,6565	ANGPT1	4,0463
ITGA4	0,2128	BCL2L1	0,6825	SOS1	1,0997	TWIST1	1,7523	CD14	4,1946
E2F1	0,2265	IRS1	0,6873	BAX	1,1019	FASLG	1,7595	MMP1	4,3384
CHEK2	0,2379	AKT2	0,6958	PIK3R2	1,1098	PDK2	1,8923	TNFRSF10B	4,5960
GRB10	0,2721	MAPK1	0,7048	GRB2	1,1300	ERBB2	1,9475	S100A4	4,6248
NME1	0,2900	COL18A1	0,7088	SRF	1,1322	TNFRSF25	2,0301	SNCG	5,1018
NME4	0,2930	IGF1R	0,7381	APC	1,1341	CDKN2A	2,1051	ITGA3	5,3265
PTPN11	0,3056	NFKB1	0,7519	PDGFRA	1,1374	FGFR2	2,1051	PLAU	5,4460
CDC25A	0,3383	PRKCB	0,7668	MAP2K1	1,1442	GZMA	2,1051	ITGA1	5,9034
HRAS	0,3555	RB1	0,7849	BAD	1,1778	IFNA1	2,1051	ITGB3	7,6254
CCNE1	0,3583	MDM2	0,7968	PDPK1	1,2100	IFNB1	2,1051	TNF	8,0644
EIF4E	0,3646	PABPC1	0,8057	MTCP1	1,2152	MET	2,1051	AKT3	13,0386
EIF4B	0,3663	EIF2AK2	0,8115	RBL2	1,2435	TIMP3	2,1051	MMP2	13,2910
EIF4EBP1	0,3904	RPS6KB1	0,8278	RAF1	1,2626	PIK3CG	2,1717	MTSS1	13,4081
CFLAR	0,3907	MYD88	0,8344	MAPK3	1,2809	TIMP1	2,3593	CDKN1A	15,0882
CDK2	0,4009	PTK2	0,8846	CASP9	1,2879	ILK	2,3701	JUN	15,3666
FAS	0,4137	CTNNB1	0,8922	B2M	1,2928	TOLLIP	2,5115	SERPINB5	16,5401
MAPK8	0,4184	MTOR	0,8956	ANGPT2	1,3047	WASL	2,5695	FOS	17,3140
BCL2	0,4397	EIF4G1	0,8971	MCAM	1,3064	NFKBIA	2,6894	SERPINE1	140,6060
GJA1	0,4627	CDKN1B	0,9037	ITGA2	1,3181	PDK1	2,8066	CXCL8	287,1803
BTK	0,5013	RAC1	0,9087	THBS1	1,3387	VEGFA	2,8441		
FKBP1A	0,5121	RASA1	0,9566	TP53	1,3417	FOXO3	2,8549		
YWHAH	0,5149	GSK3B	0,9619	PIK3CA	1,3660	NFKBIA	2,8721		
IGF1	0,5172	SYK	0,9722	ELK1	1,3822	PDGFB	2,9041		
CSNK2A1	0,5381	RHOA	0,9855	TCL1A	1,3825	PLAUR	2,9231		
MTA1	0,5464	PRKCZ	0,9915	RPS6KA1	1,4487	SHC1	3,0176		
CDC42	0,5472	PDGFA	1,0072	ATM	1,4576	TSC2	3,0451		
BRCA1	0,5504	TGFBR1	1,0099	ITGB5	1,4852	TNFRSF1A	3,1819		
PNN	0,5939	PTEN	1,0366	ADAR	1,4884	CASP8	3,2412		
CDK4	0,6037	ETS2	1,0490	TLR4	1,5215	HTATIP2	3,2829		
RPL13A	0,6371	MTA2	1,0561	IRAK1	1,5416	ITGAV	3,4380		
AKT1	0,6421	PIK3R1	1,0577	TGFB1	1,5501	TIRAP	3,4451		
MAPK14	0,6642	TERT	1,0717	PRKCA	1,5615	EPDR1	3,5433		
CHUK	0,6710	RHEB	1,0741	TSC1	1,5995	MMP9	3,9204		

Os níveis de expressão do RNAm em células K562 tratadas com NT157 (0,8 µM) por 48 horas foram normalizados por aqueles verificados nas células K562 tratadas com veículo, e os genes que apresentaram variação ≥ 2 vezes (genes com expressão $<0,5$ e genes com expressão >2) após o tratamento estão indicados em negrito.