
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão dos genes da via mTORC1 e seu envolvimento nas
Neoplasias Mieloproliferativas**

Natália de Souza Nunes

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão dos genes da via mTORC1 e seu envolvimento nas
Neoplasias Mieloproliferativas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para Obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Natália de Souza Nunes

Orientadora: **Profa. Dra.** Fabíola Attié de Castro

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências Aplicadas à Farmácia em 09/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

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.

Nunes, de Souza Natália

Expressão dos genes da via mTORC1 e seu envolvimento nas Neoplasias Mieloproliferativas da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.

109 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Castro, Attié Fabíola.

1. Neoplasias Mieloproliferativas. 2. Via de sinalização mTOR 3. Ciclo Celular. 4. Expressão Gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália de Souza Nunes

Expressão dos genes da via mTORC1 e seu envolvimento nas Neoplasias Mieloproliferativas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta Tese a todas as mulheres que exercem tarefas múltiplas, são mães, esposas, filhas, irmãs, profissionais e ainda assim não desistem do seu aprimoramento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, sempre dispostos a ajudar, por terem doado as amostras para a realização deste trabalho.

À Profª Drª Fabíola Attié de Castro por sua orientação, ensinamentos, disponibilidade e amizade que me ajudaram a concretizar esta tese. Obrigada por confiar na minha capacidade e não desistir da realização deste trabalho.

À Profª Drª Ana Maria de Souza por ser além de uma tia querida uma profissional admirável e meu maior exemplo no meio acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de doutorado concedida para o desenvolvimento desta pesquisa (2012/13495-5).

À Luciana Ambrosio, amiga e companheira de trabalho, por toda ajuda e 'socorro' prestado durante este trabalho.

Às amigas de trabalho, Sandra, Maira, Gabriela, Jussara pela colaboração e apoio.

Aos médicos hematologistas Belinda Pinto Simões e Elizabeth Xisto Souto por colaborarem na seleção de pacientes e coleta de material para estudo

Ao meu marido, companheiro e amigo, Aislan Eduardo Pereira Marques, por compreender minha ausência, o meu estresse, meu acúmulo de tarefas e mesmo assim, sempre me apoiar e dedicar seu amor e carinho

À toda minha família (pais, irmãos, sobrinhos, cunhados), em especial meus pais pelo exemplo de determinação, caráter, dedicação e amor.

À Deus, força maior que sempre guia nossos caminhos.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário
que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro
passo.”

Martin Luther King

RESUMO

NUNES, DE SOUZA, N. Expressão dos genes da via mTORC1 e seu envolvimento nas Neoplasias Mieloproliferativas, 2016 109f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs) se caracterizam por apresentarem acúmulo de eritrócitos, leucócitos e plaquetas morfológicamente normais e seus precursores. Nos últimos anos vários estudos buscaram conhecer os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia e evolução dessas desordens, com o intuito de encontrar marcadores de diagnóstico, prognóstico e terapias eficazes. A mutação pontual no gene que codifica a enzima Janus Kinase 2 (JAK2 V617F), presente em aproximadamente 90% dos pacientes com PV e em 50% dos pacientes com TE e MF, foi o principal achado genético anormal associado a essas doenças. Essa mutação resulta na ativação constitutiva da enzima JAK2 e na desregulação da proliferação celular e resistência à apoptose. Nosso grupo de pesquisa descreveu em PV, TE e MF a expressão alterada de genes reguladores da apoptose e dados da literatura indicam que a desregulação do ciclo celular contribui para a fisiopatologia das NMPs. Nesse projeto o intuito foi investigar a associação da via de sinalização m-TOR com as alterações do ciclo celular e via JAK/STAT nas NMPs. A via de sinalização m-TOR participa dos processos celulares de sobrevivência e proliferação. A estratégia experimental foi avaliar a expressão de genes e proteínas, reguladores da via m-TOR, em leucócitos de pacientes com NPMC e linhagens celulares JAK2+ tratadas com inibidores de JAK2 e AKT. Para determinar a relação da via m-TOR nas NMPs foi escolhido o gene *eIF4E*, alterado nessas doenças, para observar sua modulação diante da inibição farmacológica nas linhagens celulares JAK2 positivas. Os resultados desse estudo contribuem para a descrição de novos alvos terapêuticos dependentes e independentes da atividade quinase JAK2 e para o melhor conhecimento da participação da via de sinalização m-TOR na fisiopatologia das NMPs.

Palavras Chave: Neoplasias Mieloprolifertivas, Via de sinalização mTORC1, ciclo celular, mutação JAK2V617F.

RESUMEN

NUNES , DE SOUZA , La expresión de genes de la vía mTORC1 y su participación en Neoplasias mieloproliferativas , 2016 109f . Tesis (doctorado) . Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo , Ribeirão Preto , 2016 .

Las neoplasias mieloproliferativas (NMPs) se caracterizan por la acumulación de los eritrocitos presentes, leucocitos y plaquetas morfológicamente normales y sus precursores. En los últimos años varios estudios han tratado de comprender los mecanismos celulares y moleculares implicados en la fisiopatología y la progresión de estos trastornos con el fin de encontrar marcadores de diagnóstico, pronóstico y terapias eficaces. La mutación puntual en el gen que codifica la enzima Janus quinasa 2 (JAK2 V617F), presente en aproximadamente el 90% de los pacientes con PV y en el 50% de los pacientes con ET y MF fue el principal hallazgo genética anormal asociada con estas enfermedades. Resultados de esta mutación en la activación constitutiva de la enzima JAK2 y la desregulación de la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis. Nuestro grupo de investigación descrito en el PV, ET y MF expresión alterada de genes reguladores de la apoptosis y datos de la literatura sugieren que la desregulación del ciclo celular contribuye a la fisiopatología de PMN. En este proyecto, el objetivo fue investigar la vía de señalización de la asociación m-TOR con los cambios del ciclo celular y JAK / STAT en NMP. La vía de señalización participa en los procesos de supervivencia y proliferación celular m-TOR. La estrategia experimental fue evaluar la expresión de genes y proteínas, reguladores de la vía de m-TOR en los leucocitos de pacientes con y líneas de células NPMC tratados con inhibidores de JAK2 los JAK2 + y AKT. Para determinar la relación de la vía de m-TOR se ha elegido el MNP gen eIF4E en estos trastornos cambiado para observar su modulación en la inhibición farmacológica en líneas celulares de JAK2 positivo. Los resultados de este estudio contribuyen a la descripción de nuevas dianas terapéuticas y actividad de la quinasa JAK2 dependiente de independientes y para una mejor comprensión de la vía de señalización de la participación de m-TOR en la fisiopatología de los PMN.

Palabras clave: Neoplasias mieloproliferativas, mTORC1 vía de señalización, ciclo celular, JAKV617F mutación.

ABSTRACT

NUNES DE SOUZA, NATALIA. A. **mTORC1 gene expression. and involvement in Myeloproliferative Neoplasms**, 2016. 109f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The myeloproliferative neoplasms (MNP) are characterized by accumulation of erythrocytes, leukocytes and platelets morphologically normal and their precursors. In recent years several studies have sought to understand the cellular and molecular mechanisms involved in the pathophysiology and progression of these disorders in order to find diagnostic and prognostic markers and effective therapies. The point mutation in the gene encoding the enzyme Janus kinase 2 (JAK2 V617F), present in approximately 90% of PV patients and in 50% of patients with ET and MF was the main abnormal genetic finding associated with these diseases. This mutation results in constitutive activation of JAK2 enzyme and the deregulation of cell proliferation and resistance to apoptosis. Our research group described in PV, ET and MF altered expression of apoptosis regulatory genes and literature data suggest that deregulation of the cell cycle contributes to the pathophysiology of MNP. In this project the aim was to investigate the signaling pathway of the association m-TOR with the changes of the cell cycle and JAK / STAT in MNP. The signaling pathway participates in the m-TOR cell survival and proliferation processes. The experimental strategy was to evaluate the expression of genes and proteins, regulators of m-TOR pathway in leukocytes from patients with and NPM1 cell lines treated with the JAK2 JAK2 + and AKT inhibitors. To determine the relationship of m-TOR pathway with MNP has been selected the *eIF4E* gene deregulated in these disorders to observe their modulation in pharmacologically inhibited cells lines JAK 2 positive. Results of this study contribute to the description of new therapeutic targets of dependent and independent JAK2 kinase activity and to a better understanding of the signaling pathway of participation m-TOR in the pathophysiology of MNP.

Keywords: Myeloproliferative Neoplasms, mTORC1 pathway, cell cycle, JAK2V617F mutation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Genes envolvidos na transformação leucêmica e modulação epigenética nas NMPs.....9
- Figura 2:** Estrutura primária da enzima JAK-2 com os quatro domínios (FERM, SH2, JH2 e JH1) e possíveis mutações, denominadas V617F (éxon 14) e do éxon 12. (A) Indicação da localização das mutações presentes no domínio JH2 da enzima (JAK2V617F e da JAK2 no éxon 12), em (B) Interação do domínio quinase JH1 com os receptores de eritropoetina (EPO). Na presença da mutação V617F a atividade quinase de JAK2 é constitutiva (adaptado de RADEK *et al*, 2015).....12
- Figura 3:** Via de sinalização mTORC1, reguladores de ativação e inibição da via mTORC1.....15
- Figura 4:** Expressão gênica das ciclinas *B1*, *E1* e *D1* em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas. Há menor expressão das ciclinas *B1* e *E1* em PV e *D1* em TE e aumento da expressão da ciclina *B1* em MF. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico Mann-Whitney.....34
- Figura 5:** Expressão dos genes *p21* e *p27* em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas. Diminuição da expressão dos genes *p27* e *p21* em pacientes com Trombocitemia Essencial. Não houve alteração nos pacientes com Policitemia Vera e Mielofibrose Primária. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico Mann-Whitney.....36
- Figura 6:** Expressão dos genes *Cdk2* e *Cdk4* em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas. Há menor expressão dos genes *Cdk2* e *Cdk4* em pacientes com Trombocitemia Essencial e Policitemia Vera, respectivamente. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico de Mann.....37
- Figura 7:** Expressão dos genes da via m-TOR em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial. Aumento na expressão dos genes *RPS6K* e *eIF4E* em pacientes com Trombocitemia Essencial. Os genes *RpTOR*, *EIF4EBP* e *mTOR* não apresentaram alteração de expressão nos pacientes com TE analisados em relação aos controles. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico de Mann-Whitney.....38
- Figura 8:** Expressão dos genes da via m-TOR em leucócitos de pacientes com Mielofibrose Primária. Diminuição da expressão do gene *RPTOR* em pacientes com Mielofibrose Primária e ausência de alteração na expressão dos genes *RPS6K*, *eIF4E*, *EIF4EBP* e *mTOR*. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), Mann Whitney test.40
- Figura 9:** Expressão dos genes da via m-TOR em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera e controles. Aumento da expressão dos genes *RPS6K*, *eIF4E*, *EIF4EBP* e *mTOR* em

leucócitos de pacientes com PV, a expressão do gene *RPTOR* não está alterada em pacientes com PV em relação aos controles. SPP (sangue periférico de pacientes) e SPC (sangue periférico de controles). SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico de Mann-Whitney.....41

Figura 10: Expressão proteica de STAT5, p-STAT-5, AKT, p-AKT, eIF4E e tubulina no lisado celular da linhagem Set-2 tratada com os inibidores das vias JAK-STAT e AKT. A linhagem SET-2 foi tratada com os inibidores JII e de AKT na concentração de 5uM durante 4h, 8h e 24h. Houve inibição da via JAK/STAT nos tempos de 4, 8 e 24h, inibição da via AKT nos tempos de 8 e 24h e inibição de Eif4e no tempo de 24h. *ctrl: controle; i-AKT : inibidor de AKT; JII: inibidor de JAK 2.....46

Figura 11: Expressão proteica de STAT5, p-STAT-5, AKT, p-AKT, eIF4E e tubulina no lisado celular da linhagem Hel tratada com os inibidores das vias JAK-STAT e AKT. A linhagem Hel foi tratada com os inibidores JII e de AKT na concentração de 5uM durante 4h, 8h e 24h. Houve inibição da via JAK/STAT nos tempos de 4, 8 e 24h, inibição da via AKT nos tempos de 8 e 24h e inibição de EIF4e nos tempos de 4, 8 e 24h para o tratamento com JII.*ctrl: controle; i-AKT : inibidor de AKT; JII: inibidor de JAK.....47

Figura 12: Expressão proteica de STAT5, p-STAT-5, AKT, p-AKT, eIF4E e tubulina no lisado celular da linhagem K562 tratada com os inibidores das vias JAK-STAT e AKT. A linhagem k562 foi tratada com os inibidores JII e de AKT na concentração de 5uM durante 4h, 8h e 24h. Houve inibição da via JAK/STAT nos tempos de 4 e 24h, inibição da via AKT nos tempos de 4, 8, e inibição de EIF4e para o tratamento de 4h com JII.*ctrl: controle; i-AKT : inibidor de AKT; JII: inibidor de JAK.....48

Figura 13: Correlação entre a expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e os parâmetros clinico-laboratoriais. Houve correlação negativa entre o gene *mTOR* e o número de plaquetas nos pacientes com PV e TE; entre o gene *mTOR* e o número de leucócitos e o índice hematócrito em TE; entre *RPTOR* e o número de leucócitos em TE; entre *EIF4EBP* e o número de leucócitos de MF e correlação positiva entre mTOR e o número de leucócitos em MF. Teste estatístico de Spermann.....50

Figura 14: Correlação entre a expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e a porcentagem de alelos mutados. Correlação negativa entre os genes *mTOR* e *RPTOR* e a porcentagem de alelos mutados em pacientes com TE; demais correlação não significativas. Teste estatístico de Spermann.....52

Figura 15: Correlação da expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 entre as Neoplasias Mieloproliferativas (TE, MF e PV). Correlações significativas para os genes *eIF4E*, *EIF4EBP*, *mTOR* e *RPTOR* entre TE vs PV e MF vs PV e entre TE vs MF e MF vs PV para o gene *RPS6K*. Teste estatístico 1way Anova (Kruskal- Wallis e Dunn's).....53

Figura 16: Comparação da expressão dos genes envolvidos no ciclo celular entre as Neoplasias Mieloproliferativas (MF, TE e PV). Comparações significativas para a expressão dos genes *p21* entre MF vs TE, *CDK4* entre MF vs PV e TE vs PV, *ciclina D1* entre MF vs TE

e ciclina B1 entre MF vs TE, MF vs PV e TE vs PV. Teste estatístico 1way Anova (Kruskal-Wallis e Dunn's).....55

Figura 17: Correlação entre expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e a expressão dos genes associados ao ciclo celular em pacientes com TE. Correlação positiva para todos os genes *RPS6K* vs ciclinas *E1, D1 e B1*; *E1EIF4e* vs ciclina *E1, D1, B1 e p21*; *EIF4EBP* vs ciclinas *E1, D1, B1, p21, p27, Cdk2 e Cdk4*; *mTOR* vs ciclinas *E1, D1, B1, p21 e p27* e *RPTOR* VS ciclina *E1, B1 e p21*. Teste estatístico Spearman 59

Figura 18: Correlação entre expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e a expressão dos genes associados ao ciclo celular em pacientes com TE. Correlação positiva para todos os genes *RPS6K* VS ciclinas *E1, B1, p21 e Cdk4*; *E1EIF4e* VS ciclina *E1, D1, B1 e Cdk4*; *EIF4EBP* vs *p21 e Cdk4*; *mTOR* vs ciclinas *E1, p21 e Cdk4*. O gene *RPTOR* não apresentou correlações significativas com os genes do ciclo celular. Teste estatístico Spearman.....61

Figura 19: Correlação entre expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e a expressão dos genes associados ao ciclo celular em pacientes com TE. Correlação negativa para todos os genes *RPS6K* VS ciclinas *B1*; *EIF4EBP* vs ciclina *B1*; *mTOR* vs ciclinas *E1, Cdk2 e Cdk4*. Os genes *EIF4e* e *RPTOR* não apresentaram correlações significativas com os genes do ciclo celular. Teste estatístico Spearman.....62

Figura 20 A: Compilação dos resultados da expressão dos genes da via m-TOR em leucócitos dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.....69

Figura 20 B: Compilação dos resultados observados nas linhagens celulares SET-2 e HEL.92.1.7 após tratamento de inibição das vias JAK2 e AKT.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de Diagnóstico das Neoplasias Mieloproliferativas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS 2008).....	4
Tabela 2: Estratificação de risco para pacientes com Mielofibrose, segundo os critérios DIPSS <i>plus</i>	6
Tabela 3: Dados laboratoriais do dia da colheita de sangue e demográficos dos pacientes com PV.....	20
Tabela 4: Dados laboratoriais do dia da colheita de sangue e demográficos dos pacientes com TE.....	22
Tabela 5: Dados laboratoriais do dia da colheita de sangue e demográficos dos pacientes com MF.....	24
Tabela 6: Dados demográficos dos pacientes controles.....	25
Tabela 7: Especificidade, marca e tipo de anticorpos primários empregadas nos ensaios de <i>western-blot</i> , com as respectivas diluições.....	32
Tabela 8: Expressão dos genes do ciclo celular na linhagem Set-2 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.....	41
Tabela 9: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem Hel92.1.7 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.....	42
Tabela 10: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem K562 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.....	42
Tabela 11: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem HelSet-2 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.....	43
Tabela 12: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem Hel 92.1.7 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.....	44
Tabela 13: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem K562 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.....	44
Tabela 14: Valores de (p) para correlações não significativas entre os genes associados à via mTORC1, os parâmetros clínico laboratoriais e a porcentagem de alelos mutados.....	51
Tabela 15: Resumo dos valores de (p) e (r) para correlações significativas entre os genes associados à via mTORC1 e os genes associados ao ciclo celular.....	63

Tabela 16: Valores de (p) para correlações não significativas entre os genes associados à via mTORC1 e os genes associados ao ciclo celular.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF – *Apoptosis-inducing factor*
AKT – *Serine/threonine-specific protein kinase*
APAF-1 – *Apoptosis protease-activatorfactor1*
ATP- adenosina Trifosfato
a1- bcl-2 related protein A1
bad – *bcl-2 antagonist of the cell death*
bak – *bcl-2 homologous antagonist/killer*
bax – *bcl-2 associated X protein*
bcl-x– *bcl-2 related gene*
bcl-w – *Antiapoptotic bcl-2 family member*
bcl-2 – *B-cell CLL / lymphoma 2*
bcr-abl – *break cluster region - Abelson*
bid – *BH3-interacting domain agonist*
bik – *bcl-2-interacting killer*
bim – *bcl-2-interacting mediator*
bok – *bcl-2-related ovarian killer*
c-DNA – *complementary DNA synthesized for reverse transcriptase*
CFU-E- Unidade formadora de colônia eritróide
c-MPL – receptor de trombopoetina
c-iap-2 – *Baculoviral IAP repeat-containing 3, apoptosisinhibitor 2*
Ct - *Threshold cycle*
dATP-desoxiadenosinatrifosfato
DD - Death domain
DIABLO – *Direct inhibitor of apoptosis protein (IAP) - binding protein with low PI*
DISC – *Death-inducing signaling complex*
DNA – *Ácidodesoxirribonucléico*
DSM- Doença sistêmica dos mastócitos
DR4 – *Death receptor 4 (TRAIL receptor 1)*
DR5 – *Death receptor 5 (TRAIL receptor 2)*
ECL – *Enhancedchemiluminescent*
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO – eritropoetina
ERK – *Extracelular sinal-regulatedkinases*
FADD - Proteínas adaptadoras FAS associada com DD
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fas/CD95 – Receptor de morte
Fas-L – *fasligand*
FCFRP-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP
FITC – *Fluorescein isothiocyanate*
flip – *Like caspase-8 (FLICE)-inhibitory proteins*
GM-SCF- Fator estimulador de colônia granulocíticamacrocítica
Hb- Hemoglobina
HCFMRP-USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP
Ht- Hematócrito
IDV – *Integrated density value*

IAPs – *Inhibitory apoptosis proteins*
IGF-I- *insulin-like growth factor*
IL-3 – *Interleucina 3*
JAK – *Tyrosine kinases of the Janus kinase family*
JAK2 – *Janus Kinase2*
JAK2 V617F – *Janus Kinase2*mutada no aminoácido 617, troca de Valina por Fenilalanina
JH2 – *JAK homology 2*
JH1 – *JAK homology 1*
kDa- Kilodaltons
LEL - Leucemia eosinofílica
LMC – Leucemia mielóide crônica
LMCA - Leucemia mielóide crônica atípica
LMMC – Leucemia mielomonocítica crônica
LNC – Leucemia neutrofílica crônica
MAPK – *Mitogen-activatingproteinkinase*
mcl-1 – Myeloid cell leukemia
MF – Mielofibrose
MOC – Medula óssea do controle
MOP – Medula óssea de paciente
NMPC- Neoplasia mieloproliferativacrônica
noxá – Proapoptotic BH3-only member of bcl-2
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – *Phosphate buffer solution*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PI3K – *Phosphoinositol - 3 kinase*
puma – p53-up-regulated modulator of apoptosis
PV – Policitemia vera
PVDF - *Polyvinylidene difluoride*
RNA – Ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
SCF – *stemcellfactor*
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SHE- Síndromehipereosínofílica
siRNA – *short interfering RNA*
SMAC – *Second mitochondria-derived activator of caspases*
SPC – Sangueperiférico do controle
STAT – *Signal transducers and activators of transcription*
TA – Temperatura de anelamento do *primer*.
TE – Trombocitemia essencial
TNF – *Tumor necrosisfactor*
TNF-R – *Tumor necrosisfactor receptor*
TRADD- *Tumor necrosisfactor associada a DD*
TRAIL – *TNF related apoptosis-inducing ligand*
USP- Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Neoplasias Mieloproliferativas: Características Gerais.....	1
1.2. Classificação de risco, Prognóstico e Tratamento das Neoplasias Mieloproliferativas.....	5
1.3. Fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas	8
1.4. Vias de sinalização m-TOR.....	14
1.5. Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas, Ciclo Celular e via de sinalização m-TOR.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Pacientes e Controles.....	19
3.2. Material.....	25
3.2.1. Linhagens celulares HEL 92.1.7, SET-2 e K562	25
3.2.2. Inibidores de tirosina quinase JAK2 e AKT.....	25
3.3. Métodos.....	26
3.3.1. Ensaio de inibição farmacológica das vias JAK-STAT e AKT.....	26
3.3.2. Isolamento de leucócitos do sangue periférico.....	27
3.3.3. Extração de RNA, síntese de cDNA e quantificação da expressão de genes por RT-PCR em tempo real.....	27
3.3.4. Detecção da mutação JAK2V617F no sangue periférico.....	29
3.3.5. Detecção da expressão de proteínas nas linhagens celulares HEL92.1.7, SET-2 e K562 por western-blotting.....	29
3.3.6. Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Detecção da mutação JAK2V617F em leucócitos de sangue periférico e porcentagem de alelos mutados.....	32
4.2. Quantificação da expressão gênica em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (PV, TE, MF).....	32

4.2.1. Níveis de expressão dos genes reguladores do ciclo celular Cdk2, Cdk4, p21, p27, ciclinas B1, E e D1 em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.....	32
4.2.2. Expressão dos genes reguladores da via m-TOR em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.....	36
4.2.3. Expressão dos genes Cdk2, Cdk4, p21, p27, ciclinas B1, E e D1 nas linhagens celulares HEL 92.1.7, SET-2 e K562 tratadas com os inibidores JAK Inhibitor I e AKT 1/2.....	40
4.2.4. Níveis de expressão dos genes reguladores da via de sinalização mTORC1 nas linhagens celulares HEL 92.1.7, SET-2 e K562, tratadas com os inibidores JAK Inhibitor I e de AKT 1/2.	42
4.2.5. Expressão proteica dos substratos das vias AKT, STAT e molécula eIF4E	44
4.2.6. Correlações entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR e os parâmetros clínicos laboratoriais em pacientes com a mutação <i>JAK2V617F</i>	47
4.2.7. Correlações não significativas entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR, e os dados relativos aos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.....	49
4.2.8. Correlações entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR e porcentagem de alelos mutados em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.....	51
4.2.9. Comparação entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR e as Neoplasias Mieloproliferativas (PV, TE e MF).	51
4.2.10. Comparação entre os níveis de expressão dos genes do ciclo celular nas Neoplasias Mieloproliferativas (PV, TE e MF).....	53
4.2.11. Correlações entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR e os genes associados ao ciclo celular em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (TE, MF e PV).....	55
4.2.12. Correlações não significativas entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR, e os níveis de expressão dos genes associados ao ciclo celular nos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.....	63
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXOS-	
ANEXO 1- Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-RP.....	79
ANEXO 2- Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias Mieloproliferativas: Características Gerais

As Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) são doenças hematológicas clonais, nas quais há proliferação de células mieloides maduras, com predominância da linhagem eritrocítica na Policitemia Vera e de plaquetas na Trombocitemia e Mielofibrose (McLORNAN; HARRISON, 2013). Essas desordens caracterizam-se pela independência ou hipersensibilidade dos progenitores hematopoéticos às citocinas e fatores de crescimento (SPIVAK, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), são classificadas como NMP: a Leucemia Mieloide Crônica (LMC) *BCR-ABL1*, Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE), Mielofibrose Primária (MF), Leucemia Neutrófila Crônica (LNC), Leucemia Eosinófila Crônica não especificada (LEC), Doença de Mastócito e Neoplasia Mieloproliferativa não classificada.

As NMP podem ser ainda divididas em cromossomo Philadelphia (Ph) positivas e negativas com base na presença da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11.2)$ (CAMPO *et al.*, 2011).

O presente texto enfocará a fisiopatologia da PV, TE e MF, cromossomo Philadelphia negativas, por essas doenças terem sido o foco desse estudo.

A Policitemia Vera (PV) caracteriza-se por mieloproliferação de eritrócitos, leucócitos e plaquetas morfológicamente normais e de seus precursores, na ausência de estímulo definido. Afeta aproximadamente 2,5 indivíduos por 100.000 pessoas por ano (SPIVAK, 2002). Estudos citogenéticos da medula óssea são normais na maioria dos pacientes com PV, sendo observadas del (20q) e trissomia dos cromossomos 8 ou 9, em 20 a 30%. Quando as alterações citogenéticas aparecem tardiamente, na evolução da doença, podem significar transformação ou evolução da PV para mielodisplasia ou leucemia aguda.

Em revisão recente, ainda não publicada, a OMS alterou os critérios de diagnóstico da PV; os valores dos parâmetros concentração de hemoglobina e hematócrito para o diagnóstico que deverão ser 16,5 g/dL e 49% para homens, e 16 g/dL e 48% em mulheres, respectivamente. A análise da morfologia da medula óssea, indicando hiperplasia da linhagem eritrocítica, também é considerada critério maior de diagnóstico para PV (TEFFERI; PARDANAMI, 2015). Pacientes com PV, em relação a indivíduos normais, apresentam risco aumentado para ocorrência de eventos trombóticos e transformação para mielofibrose e leucemia mieloide aguda (MCMULLIN *et al.*, 2015).

A Trombocitemia Essencial (TE) é caracterizada por excessiva proliferação de megacariócitos na medula óssea (MO) e número aumentado de plaquetas circulantes ($450 \times 10^9/L$), que ocorre na ausência de estímulo fisiológico reconhecível. Esta observação decorre do fato de que precursores megacariocíticos na TE são capazes de dar origem a colônias celulares *in vitro* na ausência de trombopoetina exógena (HARRISSON; GREEN, 2003; GREEN *et al.*, 2004). Na TE, os níveis séricos de trombopoetina (TPO) estão normais e não foram descritas mutações no gene da TPO ou de seu receptor (c-mpl) (TEFFERI, 2001). Como na PV, a principal complicação na TE é a trombose, com eventos hemorrágicos ocorrendo menos comumente. Sua incidência é de aproximadamente 2,5 casos por 100.000 indivíduos por ano, sendo mais prevalente em mulheres. (SPIVAK, 2002)

A Mielofibrose primária (PMF) caracteriza-se pela proliferação clonal de megacariócitos e polimorfonucleares na medula óssea acompanhada pela deposição de tecido conectivo, fibrose, hematopoese extramedular, esplenomegalia e anemia (CHOI *et al.*, 2015). A incidência da mielofibrose varia de 0,4 a 1,3 casos por 100.000 pessoas por ano.

O quadro clínico instala-se lentamente, sendo descoberta na maioria das vezes pela detecção da esplenomegalia durante exame físico ou radiológico. Nas fases mais avançadas da doença, o paciente apresenta sudorese noturna, astenia progressiva, perda de peso, dores

ósseas e edema. A mielofibrose pode ser advinda da evolução da PV e TE. As causas de óbito mais comuns são: infecções, evolução para leucemia aguda, insuficiências cardíacas e hepáticas e sangramento. (TEFFERI; PARDANAMI, 2015).

A primeira tentativa de estabelecer critérios para o diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas, ocorreu em 1967 (TEFFERI *et al.*, 2009) e tinha como base a exclusão de outras causas de eritrocitose ou trombocitose, subutilizando a histologia de medula óssea, a qual só passou a fazer parte de modo fundamental dos critérios diagnósticos elaborados pela OMS em 2001.

Recentemente, a descrição de mutações no gene da proteína quinase JAK2 e outras alterações moleculares juntamente com parâmetros hematológicos e a observação da histologia de medula óssea possibilitaram o aprimoramento dos critérios diagnósticos (Tabela 1) (CAMPO *et al.*, 2011; VARDIMAN *et al.*, 2009).

Tabela 1: Critérios de Diagnóstico das Neoplasias Mieloproliferativas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS 2008).

	Policitemia Vera	Trombocitemia Essencial	Mielofibrose
Critérios maiores	Hb > 18,5 g/dL (homens) e > 16,5 g/dL (mulheres)	Plaquetas > 450 x 10 ⁹ /L	Proliferação de megacariócitos; e atipia acompanhada de fibrose do colágeno ou reticulina
	Presença de mutação <i>JAK2V617F</i> ou <i>JAK2</i> exon 12	Presença de megacariócitos grandes e maduros	Exclusão LMC, PV, SMD ou outra neoplasia mieloide.
		Exclusão de LMC, PV, MF, SMD ou outra neoplasia mieloide.	JAK2V617F ou outro marcador clonal ou evidencia de fibrose medular reativa
		JAK2V617F ou outro marcador clonal ou ausência de trombocitose reativa.	
Critérios menores	Mieloproliferação das 3 linhagens Níveis séricos de EPO abaixo do normal Colônias eritróides endógenas		Leucoeritroblatose Aumento dos níveis séricos de LDH Anemia Esplenomegalia palpável

EPO: eritropoetina; Hb: hemoglobina; LMC: Leucemia Mieloide Crônica, PV: Policitemia Vera; SMD: Síndrome Mielodisplásica; MF: Mielofibrose; LHD: lactato desidrogenase. (VARDIMAN *et al*, 2009)

1.2 Classificação de risco, Prognóstico e Tratamento das Neoplasias Mieloproliferativas

Estudos recentes apontam os fatores de risco envolvidos na classificação das Neoplasias Mieloproliferativas e sua associação com o prognóstico da doença, assim como para a escolha do tratamento.

Em comparação a população em geral com idade superior a 60 anos, os pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas possuem a expectativa de vida inferior, de aproximadamente 20 anos após diagnóstico para pacientes com TE, 14 anos para pacientes com PV e 6 anos para pacientes com MF. Para pacientes com idade inferior a 60 anos, a expectativa de vida é superior 33, 24 e 15 anos, respectivamente, a dos pacientes com mais de 60 anos, mas ainda inferior àquela observada na população em geral (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

Os principais fatores de risco relacionados à transformação da doença e menor sobrevida em pacientes com TE e PV, em geral, consistem em idade avançada do paciente, leucocitose, ocorrência de eventos trombóticos, anemia e presença de cariótipo anormal. A transformação leucêmica, em 20 anos, atinge taxas aproximadas de 10% para pacientes com PV e 5% para pacientes com TE; as taxas de transformação fibrótica mostram-se pouco superiores. A presença da mutação JAK2V617F com porcentagem de alelos mutados superior a 50% está associada a maior chance de transformação leucêmica em pacientes com PV e maior risco de apresentar trombose arterial e menor risco de transformação fibrótica em pacientes com TE (TEFFERI; PARDANANI, 2015; TEFFERI, 2015).

O DIPSS-plus (*Dynamic International Prognostic Scoring System*), sistema utilizado para classificação de risco e prognóstico dos pacientes com Mielofibrose considerava, até recentemente, os fatores: idade, parâmetros laboratoriais como concentração da hemoglobina, número de leucócitos, presença de blastos circulantes, cariótipo anormal e

número de plaquetas, sintomatologia e necessidade de transfusões sanguíneas para estratificação dos pacientes (Tabela 2). Entretanto, estudos recentes apontam para a relação direta da presença das mutações CALR e ASXL1 (*Additional Sex Combs-Like 1*) com a sobrevida dos pacientes independente da categoria determinada pelo DIPSS plus.

Em linhas gerais, a presença da mutação CALR está ligada a maior sobrevida dos pacientes e a presença da mutação ASXL1 a menor sobrevida, numa razão de 10,4 anos vs 2,3 anos para os perfis CALR⁺ASXL1⁻ VS CALR⁻ASXL1⁺, respectivamente (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

Tabela 2. Estratificação de risco para pacientes com Mielofibrose, segundo os critérios DIPSS^{plus}.

Risco	Fatores*	Sobrevida (anos)
Baixo risco	0	15,4
Intermediário 1	1	6,5
Intermediário 2	2-3	2,9
Alto risco	4 ou +	1,3

*Fatores: idade >65 anos; Hb < 10g/dL; leucócitos >25.000/μL; ≥ 1% blastos circulantes; cariótipo anormal; necessidade de transfusão; plaquetas < 100 x 10³/μL. Cada fator corresponde a 1 ponto (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

Até o momento, as principais terapias disponíveis para o tratamento dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas atuam na sintomatologia e prevenção da ocorrência de eventos trombóticos, e não demonstram efetiva possibilidade de cura, ou seja, são paliativas.

Para pacientes com PV e TE de baixo risco, o uso de aspirina atua em sintomas microvasculares como eritromelalgia, enxaquecas e eventos vasculares e no controle da ocorrência de eventos trombóticos, assim como a realização de flebotomia em pacientes com PV mantém níveis adequados de hematócrito (inferior a 45%). Pacientes de alto risco, com mais de 60 anos e histórico de trombose, requerem a utilização de terapias citorrredutoras, sendo a hidroxycarbamida (hidroxiuréia) o medicamento de escolha. Para os pacientes

resistentes/intolerantes a hidroxycarbamida, o tratamento substitutivo é utilização de interferon-alfa e bussulfano. (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

A única terapia curativa para pacientes portadores de Neoplasias Mieloproliferativas é o transplante de medula óssea, com indicação até o momento, apenas para pacientes com Mielofibrose, de risco intermediário 2 ou alto risco de MF (DIPSS), devido à alta morbidade e risco de morte associada (mais de 50% dos transplantados). Ademais, o tratamento de escolha para pacientes com MF é a hidroxiuréia e o inibidor de JAK2 (ruxolotinib) para os pacientes refratários à primeira escolha (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

As terapias de escolha referidas apresentam sobre os inibidores de JAK2, a vantagem de apresentarem eficácia e segurança na utilização em longo prazo, não sendo observada, até o momento, qualquer atividade leucemogênica associada ao uso de hidroxiuréia, interferon alfa e bussulfano.

A utilização de inibidores de JAK2, não tem sido efetiva na redução da porcentagem de alelos mutados da mutação JAK2V617F ou na indução de remissão, apesar de mostrar-se efetiva na redução da esplenomegalia e alívio da sintomatologia (TEFFERI; PARDANANI, 2015; VANNUCHI; BARTALUCCI, 2013).

O sucesso limitado dos inibidores, em teste e aprovados para uso, se deve em parte à sua inespecificidade, conferindo efeito mielossupressor sobre a proteína JAK2 normal.

Pelo exposto, o melhor conhecimento da patogênese das NMP, JAK2 positivas e negativas, ainda é necessário para a descrição de fármacos mais eficientes para o tratamento dessas doenças. Assim sendo esse estudo, investigou a via de sinalização m-TOR em células de pacientes com NMP.

1.3 Fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas

As principais alterações moleculares associadas à patogênese das NMP são: (1) mutação somática no gene que codifica a JAK-2 (Família Janus quinase - JAK), mutação JAK2V617F, presente em 98% dos pacientes com PV, 55% - 65% dos pacientes com MF e 50% -60% dos pacientes com TE; (2) mutações nos genes da calreticulina (CALR) e (3) MPL (*myeloproliferativeleukemia vírus oncogene*), ausentes na PV, e frequentes em 20% - 25% e 3% - 4%, nos pacientes com TE e 20% - 25% e 6% - 7% nos pacientes com PMF, respectivamente.

Dez a 15% dos pacientes com MF e TE não apresentam qualquer mutação e são chamados 'triplo negativos'. Em recente revisão a OMS associa as novas mutações descritas, CALR e MPL, ao diagnóstico e prognóstico das NMP (TEFFERI; PARDANAMI, 2015).

Outras alterações moleculares, exemplificadas na Figura 1, como: 1) a mutação 'Ten-eleven- translocation 2' (*TET2*), uma enzima com importante participação na demetilação do DNA e mielopoese frequente em aproximadamente 12% dos pacientes com NMPs, e 2) mutação no gene *ASXL1* (*Additional sex combs like 1*) que está relacionada à alteração nos níveis de transcrição e mau prognóstico em pacientes com doenças mieloides malignas, mutação no gene *CBL* (Casitas B-cell lymphoma) relacionada à progressão para leucemia aguda, entre outras, compõem o perfil molecular das NMPs (SAEIDI, 2015).

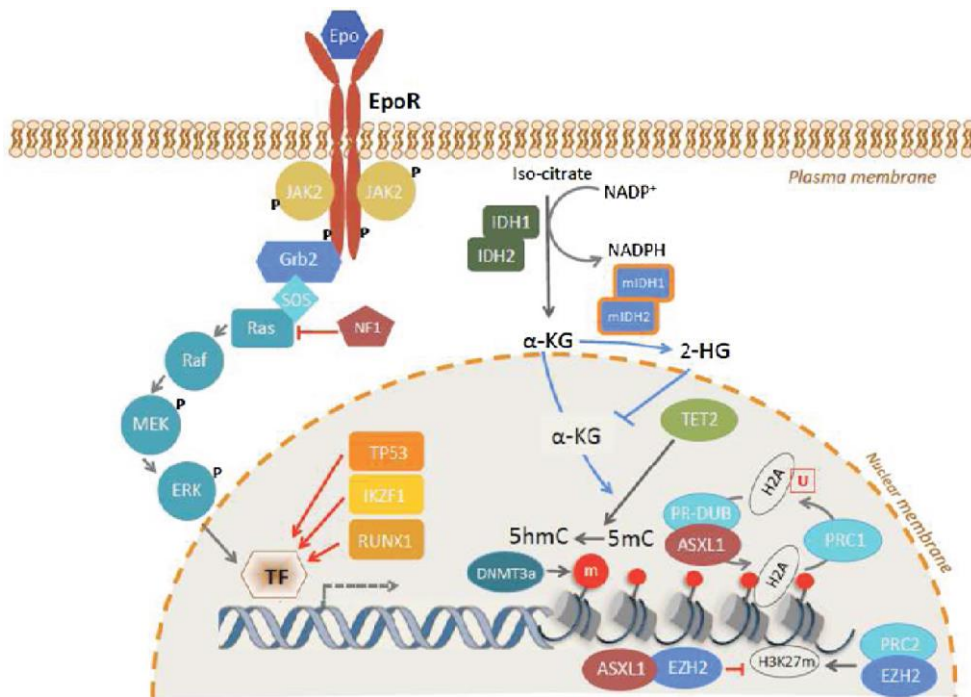


Figura 1: Genes envolvidos na transformação leucêmica e modulação epigenética nas NMPs. Critical Reviews in Oncology / Hematology DOI: (10.1016/j.critrevonc.2015.11.004), Kolsoum Saeidi, 2015.

A presença da mutação JAK2V617F ou o aumento no número de alelos mutados JAK2V617F aparentemente não está associado à alteração na sobrevida ou transformações leucêmicas em PV e TE. Em pacientes com TE, a presença da mutação JAK2V617F tem sido associada a alto risco de trombose arterial e baixo risco de transformação para mielofibrose. Em pacientes com PV, observa-se associação do maior número de alelos mutados à presença de prurido e transformação fibrótica. A mutação JAKV617F associa-se, em pacientes com idade avançada, a altos níveis de hemoglobina, leucocitose e trombocitopenia (TEFFERI, 2015).

A presença da mutação no éxon 12 da proteína JAK2 está associada à menor idade no momento do diagnóstico, predominância da proliferação da linhagem eritróide e baixos níveis de eritropoietina, entretanto o prognóstico mostra-se semelhante àquele apresentado pelos pacientes com amutação JAK2V617F (TEFFERI, 2015).

A mutação CALR em pacientes com TE, está associada à idade jovem, sexo masculino, número elevado de plaquetas, baixos níveis de hemoglobina, leucopenia e baixa incidência de eventos trombóticos. Em pacientes com MF a mutação da CALR também está associada a pacientes jovens e número elevado de plaquetas, porém com melhor perfil prognóstico, mostrando baixa frequência de anemia e leucocitose (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

Os dados clínico-laboratoriais relacionados à mutação MPL não apresentam muita consistência, sendo possível associá-los à idade avançada, sexo feminino, baixos níveis de hemoglobina e número elevado de plaquetas, no entanto, sem qualquer relação, até o momento, com sobrevivência ou transformação leucêmica (TEFFERI, 2015).

As mutações específicas parecem ser suficientes, mas não essenciais para o desenvolvimento destas doenças, fatores como carga alélica presente e ordem de aquisição das mutações contribuem para a determinação dos perfis clínico patológicos (TEFFERI; PARDANANI, 2015).

As mutações na JAK2 e em genes transdutores de sinais seriam responsáveis pelas alterações na sinalização da via JAK-STAT, a qual transduz sinais de receptores de citocinas e fatores de crescimento como Eritropoietina (EPO), Fator Estimulante de Colônia (CSF), Fator Estimulante de Colônia Granulocítica–Monocítica (GM–CSF), Interleucina-3 (IL-3), Trombopoetina (TPO) e IGF-(1) (*insulin-like growth factor*), imprescindíveis na diferenciação das células da linhagem mieloide (SPELETAS *et al.*, 2007; REILLY, 2006).

JAK2 é uma proteína que se liga a parte intracitoplasmática dos receptores de citocinas do tipo 1 homodimérico e do tipo 1 e 2 heterodimérico pelo domínio FERM. A ligação da citocina ao receptor induz a transfosforilação das JAK2 e, em seguida, a fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor, levando ao recrutamento e fosforilação das proteínas sinalizadoras PI3K (*Phosphoinositol - 3 kinase*), RAS (Rat Sarcoma Virus) e

STAT5 (*Signal transducers and activators of transcription*) (VAINCHENKER *et al.*, 2007; KISSELEVA *et al.*, 2002).

A porção quinase localiza-se no terminal carboxil da proteína (domínio de homologia JH1), o qual é adjacente ao domínio pseudoquinase inativo cataliticamente, o domínio de homologia JH2 que é responsável pela inibição basal da atividade da JAK (KAUSHANSKY, 2007).

A mutação que ocorre na JAK2 é pontual e consiste na substituição da base nucleotídica G por T na posição 1849 do gene, o que conduz a troca de valina pela fenilalanina no domínio pseudoquinase JH2 da sequência polipeptídica da JAK2 (Figura 2).

Com a alteração promovida pela mutação, esse domínio perde a função de regular negativamente o domínio quinase JH1 ocasionando aumento da atividade de quinase de JAK2 e hiperresponsividade das células à sinalização de citocinas (KHWAJA, 2006) e das vias de sinalização STAT5, MAPK/ERK e PI3K/AKT (VAINCHENKER *et al.*, 2007).

Originalmente, a mutação JAK2V617F foi descrita em progenitores mieloides (BAXTER *et al.*, 2005), no entanto há evidências de sua presença em nos progenitores linfomieloides de pacientes com PV e MF (BOGANI *et al.* 2007).

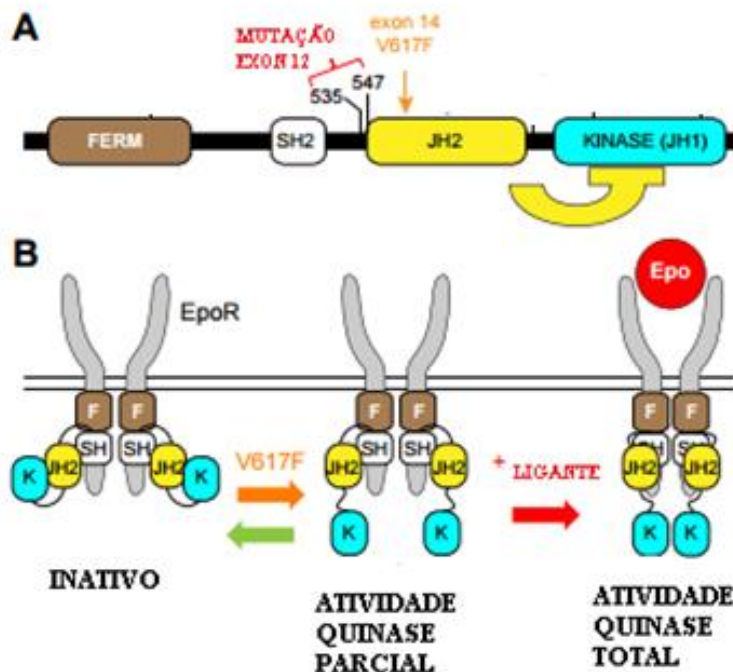


Figura 2: Estrutura primária da enzima JAK-2 com os quatro domínios (FERM, SH2, JH2 e JH1) e possíveis mutações, denominadas V617F (exon14) e do exon12. (A) Indicação da localização das mutações presentes no domínio JH2 da enzima (JAK2V617F e da JAK2 no exon12), em (B) Interação do domínio quinase JH1 com os receptores de eritropoetina (EPO). Na presença da mutação V617F a atividade quinase de JAK2 é constitutiva (adaptado de RADEK *et al.*, 2015).

Outras alterações celulares e moleculares têm sido implicadas na patogênese das NMP, dentre elas destacam-se as alterações em moléculas envolvidas no controle da apoptose celular, genes da família Bcl-2, família dos receptores de morte e o gene *PRV-1* (GASPAROTTO, *et al.*, 2013; TOGNON *et al.* 2012 e 2013). O aumento da expressão de genes e proteínas anti-apoptóticos e diminuição dos pró-apoptóticos contribui para a resistência das células hematopoéticas à apoptose, promovendo o mieloacúmulo presente nas NMP.

Alterações epigenéticas como perfis de metilação e de expressão de microRNAs alterados também já foram descritos nas NMP. NUNES e colaboradores (2013) descreveram a alteração na expressão de microRNAs reguladores da maquinaria apoptótica em

Neoplasias Mieloproliferativas (TE, PV e MF), sugerindo que esses achados podem estar relacionados aos diferentes padrões de desenvolvimento da PV, TE e MF. Esses achados representam novas perspectivas na busca por marcadores de prognóstico e apontam para potenciais novos alvos terapêuticos para os pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.

Em trabalho recente Tognon e co-autores (2015) analisaram o perfil de metilação de genes associados ao ciclo celular e apoptose em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas e demonstraram que pacientes com PV e MF JAK2V617F positivos apresentam perfil de metilação semelhantes, enquanto que pacientes com TE positivos e negativos para a mutação JAK2V617F apresentam perfil de metilação semelhantes entre si e ao grupo controle. Os resultados indicaram que em pacientes JAK2 mutados os genes pró-apoptóticos da via do receptor de morte e das vias das caspases efetoras estavam silenciados pela hipermetilação contribuindo para o fenótipo de resistência à apoptose celular nesses pacientes. Ainda neste estudo, a análise da metilação para os mesmos genes na linhagem HEL demonstrou aumento na metilação dos genes associados ao ciclo celular *CICLINA E1* e *P21* e decréscimo destas metilações após tratamento com JAK inhibitor I (JII).

Apesar de todos os conhecimentos supracitados, nenhuma terapia eficaz foi ainda desenvolvida para as NMP e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese do desenvolvimento de doenças fenotípicas tão heterogêneas como a PV, TE e MF não foram totalmente elucidados.

Nesse contexto, estudos dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese das NMP são importantes na busca de novas ferramentas destinadas ao diagnóstico diferencial da PV, TE e MF e para descrição de novos alvos terapêuticos. O presente trabalho contribuiu com a descrição da potencial relação entre a via m-TOR e a patogênese das NMP.

1.4 Vias de sinalização m-TOR

mTOR, é uma serina/treonina quinase, principal reguladora da síntese de proteínas, participa da tradução de genes como ciclina *D1*, *Bcl-2*, *Bcl-X_L*, desempenhando papel fundamental no crescimento e sobrevivência celular (BOGANI *et al.*, 2013; MEMMOTT; DENNIS, 2009).

m-TOR é ativada em resposta a estímulos externos como hormônios, fatores de crescimento e nutrientes. Na presença de estímulos mitogênicos, mTOR transduz sinais que ativam a tradução de proteínas Cap dependentes e promovem o crescimento celular, com papel central na complexa rede de vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR em funções fisiológicas normais e eventos patogênicos (KELLY *et al.*, 2011).

O componente mTORC1, complexo alvo deste estudo, está diretamente envolvido no recrutamento ribossomal para a tradução de mRNA através da fosforilação das proteínas S6K, 4E-BP1, eIF4E e rS6. A fosforilação do fator 4EBP1 resulta em sua inativação, enquanto a fosforilação do fator S6K, promove sua ativação e consequente promoção da tradução de proteínas e crescimento celular (MEMMOTT; DENNIS, 2009; EL-HABR, *et al.* 2014).

A via de sinalização mTORC1 pode ser regulada de maneira dependente ou independente de AKT. AKT indiretamente ativa mTORC1 pela fosforilação direta do supressor de tumor TSC2 (*tuberoussclerosis*), que forma um complexo heterodimérico com TSC1, e inibe a atividade GTPase desse complexo. Como TSC2 suprime a atividade de Ras-GTPase-Rheb, um ativador seletivo de mTORC1, a inibição de TSC2 por AKT resulta na ativação de mTORC1. De maneira independente, a via de sinalização mTORC1 é ativada por sinais mitogênicos através da ativação da via Ras/Mek/ERK. A fosforilação de TSC2 por ERK promove a dissociação do complexo *tuberoussclerosis* e alivia a inibição de mTOR nas células mediada pelo complexo. Inúmeros estudos demonstram a importância da via de

sinalização Ras-MAPK na promoção da tumorigênese mediada por mTOR através da inibição de TSC2 pós fosforilação por ERK (MEMMOTT AND DENNIS, 2010) (Figura 2).

Há outras formas de regulação de mTOR ligadas a fatores fisiológicos, como status energético das células, depleção intracelular de energia, privação de nutrientes (disponibilidade de aminoácidos) e a hipóxia, que inibem sua ativação. O aumento dos níveis intracelulares dos aminoácidos leucina e isoleucina estão associados à indução da fosforilação dos substratos S6k1 e 4EBP1e consequente ativação da via m-TOR (MEMMOTT; DENNIS, 2010) (Figura 3).

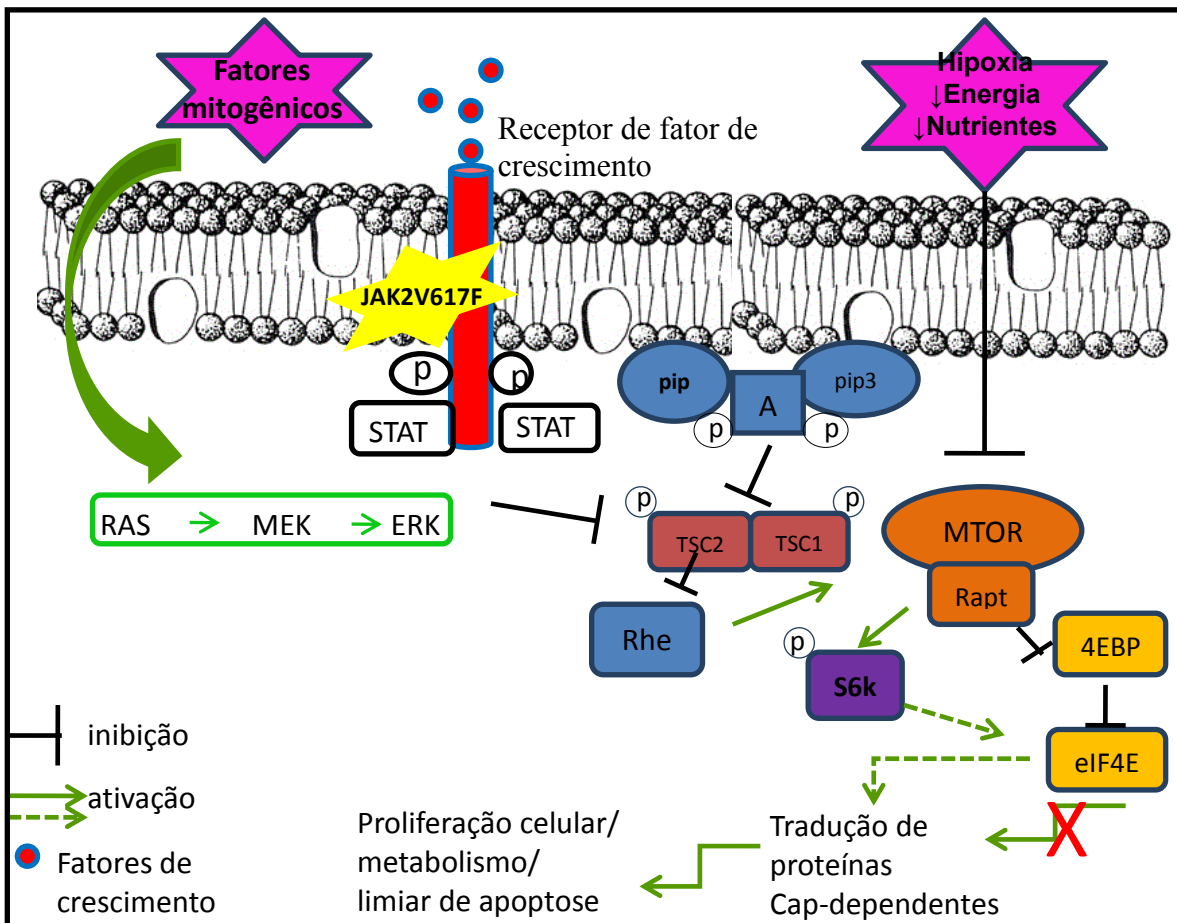


Figura 3: Via de sinalização mTORC1, reguladores de ativação e de inibição da via mTORC1.

A via m-TOR regula positivamente o ciclo celular na transição G1/S por meio da supressão da ciclina D1 e pelo aumento da degradação do inibidor de ciclina quinase

dependente (cdk), o p27. Por esta razão, fármacos anti-mTOR estão sendo desenvolvidos como terapias antitumorais (DOBASHI *et al*, 2011) visando o controle do ciclo celular.

A relação da modificação da via m-TOR com a patogênese de doenças hematológicas foi ressaltada por DOBASHI *et al* (2011) que descreveu que a ativação de mTOR pela proteína BCR-ABL é fundamental para progressão da LMC, e por DAZERT e HALL que demonstraram a *hiperfosforilação* dos substratos S6K e 4E-BP1, em leucemia mieloide aguda (LMA).

1.5 Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas, Ciclo Celulare via de sinalização m-TOR

As vias de sinalização PI3K/Akt/mTor estão ativadas em diversos cânceres humanos e associam-se a resistência celular às drogas anti-tumorais tanto em neoplasias sólidas como também em hematológicas. Por essa razão, a via m-tor tornou-se um alvo terapêutico atrativo para estudo em NMPs, como demonstrado em trabalho recente da literatura que relata níveis elevados de pStat5, pAkt e p-mTOR em progenitores hematopoéticos derivados de pacientes com NMP (McLORNAN; HARRISON, 2013).

A alteração da expressão de genes envolvidos no controle de ciclo celular, como *Rb* (Retinoblastoma), ciclina quinase dependente (*cdk*, cyclin-dependentkinase) e inibidores de *CDK*, é um achado frequente em neoplasias (DAÍ; KRANTZ, 2001). A literatura tem descrito anormalidades na expressão de genes *p16INK4aep14ARF* em NMP, como a PV, especulando que essas alterações seriam a resposta celular às anormalidades em reguladores de ciclo celular como Ciclina D, CDK4/CDK6, Rb ou E2F (DAÍ; KRANTZ, 2001). Em linhagens celulares, alterações em moléculas envolvidas em ciclo celular como p27 e Src já foram relacionadas à atividade da enzima mutada JAK2V617F presente na PV, TE e MF (FURUHATA *et al.*, 2009).

Nakatake e colaboradores (2011) demonstraram, utilizando a linhagem celular Ba/F3-EPOR e cultura de células CD34⁺ de pacientes com NMPC, que a degradação da proteína p53, mediada pela E3 ubiquitina ligase, está associada à ativação independente de citocinas em células JAK2V617F positivas.

Assim sendo, a descrição de alterações em ciclo celular e das vias que interagem com esse processo e com M-TOR são fundamentais para compreensão da patogênese das NMP. A ativação da via de sinalização AKT, resulta na inibição do TSC 1/2 (*Tuberous Sclerosis Complex*) e, conseqüentemente, no aumento da atividade de mTOR. Em paralelo à ativação de mTOR e seu controle na proliferação celular, metabolismo e limiar de apoptose, a ativação de AKT também atua no estado proliferativo e anti-apoptótico das células mediante inibição da procaspase 9 e do gene pró-apoptótico BAD (McLORNAN; HARRISON, 2013).

Com o intuito de aprofundar o conhecimento desses mecanismos fisiopatológicos em pacientes com NMP, avaliamos a expressão de moléculas das vias de sinalização m-TOR e suas relações com proteínas do ciclo celular em leucócitos de pacientes com NMP e linhagens positivas para mutação JAK2V617F, HEL 92.1.7 e SET-2.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencial interação de moléculas da via m-TOR e ciclo celular em linhagens celulares e leucócitos de pacientes com NMP.

2.2 Objetivos Específicos

a) Quantificar a expressão de genes associados à regulação do ciclo celular e via m-TOR em:

- leucócitos de pacientes com PV, TE e MF e controles;

- linhagens celulares HEL 92.1.7, SET-2 e K562, tratadas com os inibidores JAK Inhibitor I e de AKT;

b) Determinar se a expressão de genes que regulam o ciclo celular e a via m-TOR é dependente da atividade de tirosina quinase JAK2;

c) Associar os dados de expressão de moléculas que regulam o ciclo celular e via m-TOR com o “status” da mutação JAK2;

d) Correlacionar os dados de expressão gênica obtidos com os parâmetros clínico-laboratoriais dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas.

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes e Controles

Foram avaliadas a expressão gênica em 34 amostras de sangue periférico de pacientes com Policitemia Vera (16 sexo feminino e 18 sexo masculino), 51 amostras de pacientes com Trombocitemia Essencial (36 sexo feminino e 15 sexo masculino), 18 amostras de pacientes com Mielofibrose Primária (4 sexo feminino e 14 sexo masculino), provenientes do Hospital de Transplantes em São Paulo e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), e em 52 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis, doadores voluntários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, que constituíram o grupo controle. (Tabelas 3a6). O acompanhamento clínico dos pacientes e a seleção para realização do trabalho foram realizados pelas hematologistas Profa. Dra Belinda Pinto Simões (HCFMRP-USP) e Dra. Elizabeth Xisto Souto (Hospital de Transplantes Euryclides de Jesus Zerbini de São Paulo, São Paulo). A coleta das amostras dos pacientes foi realizada ao diagnóstico, quando os pacientes ainda não se encontram submetidos a tratamento ou após 15 dias de suspensão da terapia de escolha.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto FCF-RP nº do Parecer 346.940 e do HCFMRP-USP (unidade coparticipante).

Tabela 3: Dados laboratoriais e demográficos dos pacientes com PV.

Amostr a	Idad e	Gênero	Cor da pele	%Alelo s JAK2	Hb (g/dL	Ht %	Plq (x10³/mm³)	Leuc. (x10³/mm³)
PV01	50	Feminino	Negra	-	19,1	57, 9	207	8,08
PV02	66	Feminino	Branca	13	11,9	34, 3	247	5,3
PV03	80	Feminino	Branca	90	15,9	44, 5	541	8,8
PV04	54	Feminino	Negra	13	12,3	37,	167	5,0
PV05	58	Masculin o	Branca	87	12,1	40	568	20,0
PV06	59	Masculin o	Branca	25	15,6	46, 6	330	8,75
PV07	54	Feminino	Branca	52	12,4	40, 6	288	7,8
PV08	68	Feminino	Branca	40	15,7	50, 3	255	6,35
PV09	83	Feminino	Branca	94	16	53, 9	420	21,3
PV10	52	Masculin o	Branca	-	17,4	53, 5	229	5,5
PV11	45	Masculin o	Negro	93	12	41, 7	202	24,3
PV12	73	Feminino	Branca	55	14,3	44	299	8,85
PV13	45	Feminino	Branca	-	15,9	49, 3	234	8,8
PV14	65	Masculin o	Branca	68,8	17,1	56, 5	738	14
PV15	76	Masculin o	Amarel o	77,8	16,1	53, 1	259	8,98
PV16	39	Feminino	Branca	57,5	16,6	49, 1	181	8,97
PV17	75	Masculin o	Branca	-	14,3	41, 6	461	9,86
PV18	60	Masculin o	Branca	57,9	11,3	33, 7	483	6,82
PV19	57	Masculin o	Branca	+	11,1	42, 7	605	18,4
PV20	79	Masculin o	Branca	45,9	11,5	36, 7	664	3,59

PV21	61	Masculin o	Amarel o	56,5	12,5	41, 0	449	6,35
PV22	79	Masculin o	Branca	70	19,5	60, 4	772	15,7
PV23	65	Feminino	Branca	31,3	21,5	62	161	9,7
PV24	69	Feminino	Branca	-	18,1	50, 7	211	3,6
PV25	69	Feminino	Amarel o	21,6	14,3	45, 6	334	6,85
PV26	78	Feminino	Branca	34,4	15,5	48, 5	531	7,34
PV27	67	Masculin o	Branca	-	22,0	74	250	792
PV28	76	Feminino	Branca	70,3	13,2	40, 1	621	14,2
PV29	65	Masculin o	Branca	73	13,5	46, 5	314	15
PV30	53	Masculin o	Branca	45	17,7	55, 9	591	21
PV31	67	Masculin o	Branca	62,1	13,9	42, 8	209	6,51
PV32	76	Feminino	Branca	59,4	16,3	52, 7	594	9,98
PV33	65	Masculin o	Branca	-	17,2	56, 5	248	5,45
PV34	52	Masculin o	Branca	-	18	51, 5	236	8,5

PV: Policitemia Vera, Hb: hemoglobina, Ht: Hematócrito, Plq: Plaquetas, Leuc: Leucócitos Totais.

Tabela4: Dados laboratoriais do dia da colheita de sangue e demográficos dos pacientes com TE.

Amostra	Idade	Gênero	Cor da pele	%Alelos JAK2	Hb (g/dL)	Ht %	Plq (x10³/mm³)	Gb (x10³/mm³)
TE01	41	Feminino	Branca	14	10	30	428	2,9
TE02	66	Masculino	Branca	7	15,7	51,2	492	11,1
TE03	40	Feminino	Branca	-	14,8	36,3	742	5,0
TE04	58	Feminino	Branca	30	16,2	34,9	425	5,6
TE05	60	Masculino	Branca	-	20,8	51,7	309	4,6
TE06	68	Feminino	Branca	-	13,1	35,9	645	3,4
TE07	54	Masculino	Branca	-	14,5	43,9	927	4,01
TE08	66	Feminino	Branca	-	11,4	34,6	707	7,5
TE09	59	Feminino	Mulata	33,3	12,2	39,5	513	5,9
TE10	62	Feminino	Negra	-	14,9	43,3	259	32
TE11	58	Feminino	Negra	-	13,2	38,9	438	6,3
TE12	73	Feminino	Branca	18	11,5	34,4	480	5,19
TE13	50	Feminino	Branca	63	15,9	44,9	438	9,09
TE14	67	Masculino	Branca	30	14,8	45,3	274	4,09
TE15	51	Feminino	Branca	30	13,2	45,8	355	6,99
TE16	75	Feminino	Branca	45	13,6	41,6	505	5,26
TE17	74	Feminino	Branca	15	12,3	37,5	304	3,35
TE18	32	Feminino	Branca	-	12,1	37,4	364	4,4
TE19	59	Masculino	Branca	61	15,9	49,7	1022	14,6
TE20	80	Feminino	Branca	72	14,8	45,7	1261	14,1
TE21	70	Feminino	Branca	27	ND	ND	ND	ND
TE22	62	Masculino	Branca	-	12,1	37,7	601	4,23
TE23	59	Feminino	Branca	-	11,7	36,7	636	4,42
TE24	35	Feminino	Branca	29,4	15,5	46,9	817	12
TE25	85	Feminino	Branca	-	13,3	41,7	907	8,35
TE26	52	Feminino	Branca	22,2	15,1	46,4	619	6,64
TE27	71	Feminino	Branca	-	13,7	42,9	556	7,57
TE28	53	Feminino	Branca	30,2	13	39,7	483	7,85
TE29	64	Masculino	Branca	7,7	15,6	48,9	529	8,9
TE30	50	Feminino	Branca	-	13,5	41,1	775	6,69
TE31	77	Feminino	Branca	-	12	38	1062	9
TE32	74	Masculino	Branca	85,2	11,4	39,2	963	49,4
TE33	66	Feminino	Branca	48,8	12,7	40,3	998	9,75
TE34	31	Feminino	Branca	-	13,6	41,1	759	6,61
TE35	61	Feminino	Branca	-	13	45,1	327	4,03
TE36	55	Feminino	Branca	-	12	37,4	399	4,41

TE37	20	Feminino	Branca	-	13,1	39,3	983	8,16
TE38	54	Masculino	Branca	-	12,5	39,8	917	10,7
TE39	46	Masculino	Branca	43,9	17,1	55,7	809	14
TE40	36	Feminino	Branca	53,1	22,4	54,7	469	7,42
TE41	48	Masculino	Branca	-	12,8	44,2	356	7,9
TE42	44	Masculino	Branca	-	10,1	34,6	438	3,96
TE43	81	Masculino	Branca	52,5	13,4	38,3	1293	15,6
TE44	59	Feminino	Branca	25,8	ND	ND	ND	ND
TE45	65	Feminino	Branca	-	13,7	41,6	402	10,2
TE46	56	Feminino	Branca	-	12,9	39,6	468	5,81
TE47	43	Feminino	Branca	80	14,7	43	475	7,14
TE48	57	Feminino	Mulata	-	13	37,6	468	5,81
TE49	53	Feminino	Branca	-	13,8	44,4	764	6,02
TE50	58	Masculino	Branca	47,8	13,4	40,7	399	4,6
TE51	34	Masculino	Branca	34,3	16	46,9	1083	7,74

TE: Trombocitemia Essencial, Hb: hemoglobina, Ht: Hematócrito, Plq: Plaquetas, Leuc: Leucócitos Totais. ND: não determinado por problemas técnicos.

Tabela 5: Dados laboratoriais do dia da colheita de sangue edemográficos dos pacientes com MF.

Amostra	Idade (anos)	Gênero	Cor da pele	%alelos JAK2	Hb (g/dL)	Ht (%)	Plq ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Gb ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
MF1	71	Feminino	Branca	87	15,9	52,9	77	14,2
MF2	41	Masculino	Branca	-	9,6	29,5	61,2	7,96
MF3	64	Masculino	Branca	-	9,88	31,8	114	2,32
MF4	52	Masculino	Branca	-	5,88	19,2	38,5	2,38
MF5	68	Masculino	Branca	-	10,3	32,3	252	4,24
MF6	55	Masculino	Branca	-	15,5	48,5	339	5,77
MF7	61	Feminino	Branca	-	11,9	37,4	117	24
MF8	59	Feminino	Branca	36	13,1	39,9	280	5,32
MF9	58	Masculino	Branca	37	8,62	26,3	71,7	2,18
MF10	62	Masculino	Branca	35	12,6	38,3	345	6,48
MF11	69	Masculino	Branca	-	8,76	26,5	389	7,16
MF12	73	Masculino	Branca	-	10,5	32,9	72,4	1,46
MF13	80	Masculino	Branca	43,8	12,4	37,7	279	4,52
MF14	78	Masculino	Branca	20,6	17,4	55,3	41,3	12,6
MF15	73	Masculino	Branca	26,5	8,97	28,9	196	6,09
MF16	65	Feminino	Branca	-	9,0	27	27	1,9
MF17	58	Masculino	Branca	48,4	14,8	45,2	129	14,8
MF18	65	Masculino	Branca	-	12,9	39,4	100	32,9

MF: Mielofibrose Primária, Hb: hemoglobina, Ht: Hematócrito, Plq: Plaquetas, Leuc: Leucócitos Totais.

Tabela 6: Dados demográficos dos controles.

Amostra	Idade	Gênero	Cor da pele
SPC1	68	Feminino	Negra
SPC2	55	Masculino	Branca
SPC3	60	Masculino	Branca
SPC4	50	Masculino	Branca
SPC5	60	Masculino	Branca
SPC6	52	Masculino	Branca
SPC7	60	Feminino	Branca
SPC8	61	Feminino	Branca
SPC9	52	Masculino	Branca
SPC10	50	Masculino	Branca
SPC11	71	Masculino	Branca
SPC12	80	Masculino	Branca
SPC13	61	Feminino	Branca
SPC14	76	Feminino	Branca
SPC15	68	Feminino	Branca
SPC16	57	Masculino	Branca
SPC17	46	Feminino	Branca
SPC18	65	Masculino	Branca
SPC19	70	Masculino	Branca
SPC20	38	Feminino	Branca
SPC21	72	Masculino	Branca
SPC22	60	Masculino	Branca
SPC23	58	Masculino	Branca
SPC24	80	Masculino	Branca
SPC25	55	Masculino	Branca
SPC26	69	Feminino	Branca
SPC27	68	Feminino	Branca
SPC28	80	Feminino	Branca
SPC29	53	Feminino	Branca
SPC30	54	Feminino	Branca
SPC31	61	Feminino	Branca
SPC32	77	Feminino	Branca
SPC33	33	Feminino	Branca
SPC34	61	Feminino	Branca
SPC35	69	Feminino	Branca
SPC36	20	Feminino	Branca
SPC37	51	Masculino	Branca
SPC38	34	Feminino	Branca
SPC39	46	Masculino	Branca
SPC40	56	Feminino	Branca
SPC41	71	Feminino	Branca
SPC42	56	Feminino	Branca
SPC43	47	Feminino	Branca

SPC44	47	Feminino	Branca
SPC45	76	Feminino	Branca
SPC46	71	Masculino	Branca
SPC47	60	Feminino	Negro
SPC48	71	Masculino	Branca
SPC49	83	Feminino	Branca
SPC50	66	Feminino	Branca
SPC51	41	Feminino	Branca
SPC52	76	Feminino	Branca

SPC: sangue periférico dos controles.

3.2Material

3.2.1 Linhagens celulares HEL 92.1.7,SET-2 e K562

As linhagens celulares HEL 92.1.7, SET-2 e K562 foram utilizadas nos experimentos de expressão gênica e proteica e cultivadas com inibidores de tirosina-quinase JAK2 e da via de AKT. A linhagem HEL 92.1.7 foi isolada de paciente com PV que evoluiu para uma eritroleucemia e é homozigota para a mutação JAK2V617F (PAPAYANNOPOULOU, 1982). A linhagem SET-2 originou-se de paciente com TE que progrediu para leucemia e é uma linhagem megacarioblástica heterozigota para a mutação JAK2V617F (UOZUMIET *al.*, 2000). As linhagens HEL 92.1.7 e SET-2 foram cedidas pelo pesquisador Thomas Radimerski (Novartis, Suíça) em colaboração com nosso grupo de pesquisa.

A linhagem K562 foi isolada de paciente com leucemia mieloide crônica em fase blástica, não apresenta a mutação para JAK2 e é positiva para o gene *BCR-ABL-1* (LOZZIO CB;LOZZIO BB, 1992). O cultivo das células foi realizado em meio de cultura RPMI-1640 completo (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium), suplementado com penicilina/estreptomicina 100 unidades/mL, Glutamina 2mM, HEPES 25mM e Bicarbonato, 10% de soro fetal bovino (SFB) à 37°C e 5% CO₂.

3.2.2 Inibidores de tirosina quinase JAK2 e AKT

Os inibidores JAK inhibitor1 (Calbiochem, San Diego, EUA)(RADIMERSKI *et al.*,2009) e AKT1/2 Kinase Inhibitor (L-9908, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)(VOL. 5, ISSUE 1, CELLSIGNALING) foram empregados para inibição de vias bioquímicas em linhagens HEL.92.1.7, SET-2 e K562.

3.3 Métodos

3.3.1 Ensaio de inibição farmacológica das vias JAK-STAT e AKT

As linhagens celulares Hel92.1.7, Set-2 (JAK2 V617F positivas) e K562 foram tratadas com os inibidores das vias JAK-STAT e AKT 1/2. As linhagens foram plaqueadas, no dia anterior ao experimento, na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 completo (suplementado com HEPES 10 mM, L-glutamina 200 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 mg/mL soro bovino fetal inativado 10% e piruvato de sódio 1mM) e inibidores JAK inhibitor I e inibidor de AKT em DMSO, na concentração de $5\mu\text{M}$, à 37°C com 5% CO_2 , por 4, 8 e 24 horas. Após os tratamentos, a inibição das vias foi confirmada pela técnica de western-blotting pela observação dos níveis de fosforilação dos substratos pSTAT e pAKT. O controle negativo foi representado por células cultivadas com o DMSO (5uL).

Após os tratamentos, as células foram coletadas e centrifugadas a 240 g, por 10 minutos, a 4°C ; ajustadas para 2×10^6 células e ressuspendidas em tampão de lise (tampão de fosfoproteína: 20mM de Tris-HCL pH 7,5, 1mM de EDTA, 150mM de NaCl, Igepal CA 630 1% v/v), tampão de fosfatase (pirofosfato de sódio 25mM, ortovanadato de sódio 10mM e β glicerolfosfato 10mM) com inibidores de protease (PIC 1% v/v), armazenados a -80°C para posterior quantificação e ensaio de Western Blotting. Células na concentração

3×10^6 células foram ressuspensas em 1 mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e armazenados a -80°C para posterior extração de RNA.

3.3.2 Isolamento de leucócitos do sangue periférico

Foram colhidos 40 mL de sangue periférico dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas e 20 mL de sangue periférico de indivíduos saudáveis (grupo controle).

Os leucócitos foram separados pelo método de Haes-esteril (Voluven[®], FrasceniusKabi, Campinas, Brasil). Nesta técnica, o sangue total foi misturado ao Haes-esteril, na proporção de 20 partes de sangue para 8 partes do reagente, homogeneizado e decantado por 90 minutos. O sobrenadante foi colhido, centrifugado a 1810 g e as hemácias presentes no precipitado foram lisadas com 2 mL de tampão de lise ACK (8,3 g/L de NH_4Cl , 1 g/L de KHCO_3 e 0,036 g/L de EDTA). Os leucócitos obtidos foram utilizados nos ensaios de expressão gênica e western-blot. Os leucócitos totais foram congelados em 1 mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) para posterior extração de RNA. Leucócitos totais do sangue periférico na concentração de 2×10^6 foram ressuspensos em 200 μL (diluição 1:1) de tampão de fosfoproteína e armazenados a -80°C para posterior quantificação e realização dos ensaios de western-blotting.

3.3.3 Extração de RNA, síntese de cDNA e quantificação da expressão de genes por RT-PCR em tempo real

O RNA total dos leucócitos dos pacientes, dos indivíduos controles e das linhagens HEL 92.1.7, SET-2, K562 foi extraído pela técnica do Trizol[®] conforme instruções do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Dessa forma, aproximadamente 10^7 células foram lisadas com 1 mL de Trizol e o RNA recuperado da fase aquosa pela adição de clorofórmio e centrifugação, seguida de precipitação com isopropanol

e centrifugação. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 13µL de água livre de RNase e DNase, água DEPC. A concentração de RNA total foi quantificada em espectrofotometria nos comprimentos de onda 260nm e 280 nm. Para obtenção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Archive Kit, na quantidade recomendada pelo fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sendo utilizado 1µg de RNA por reação e o seguinte ciclo: 25°C por 10 minutos e a 37°C por duas horas no equipamento Mastercycler (Eppendorf AG, HA, Germany). O cDNA das linhagens HEL 92.1.7, Set-2 e K562 obtidos foram empregados nos ensaios de expressão gênica para quantificação de genes de interesse por real time PCR. Os genes selecionados foram aqueles que codificam moléculas que promovem a interação das vias de sinalização investigadas. Para essa finalidade, foram utilizados *primers* e sondas inventariadas (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) dos seguintes genes envolvidos na regulação do ciclo celular e via m-TOR como as ciclinas: B (Hs0025916_m1), D1 (Hs00765553_m1), E (Hs0102654_m1), p21 (Hs00355782_m1), p27 (Hs01597588_m1) e CDK2 (Hs01548894_m1) e os componentes da via m-TOR: mTOR (Hs00234508_m1), raptor (Hs00375332_m1), 4E-BP1 (Hs00607050_m1), eIF4E (Hs00854166_m1) e RPS6K1b (Hs00177357_m1). Foram utilizados 2µL de cDNA e 8µL (mix sonda e taqman) por poço de reação. Os ciclos de amplificação empregados no real time foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA).

Os resultados foram expressos pelo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, com base no C_t (cycle Threshold) do gene testado e dos genes endógenos, *GAPDH* e *B-ACTIN*, em relação as amostras normais (calibradores, grupo controle). Foi estabelecida a média geométrica entre os genes endógenos, realizada a diferença entre o gene analisado e a média geométrica dos endógenos, do resultado obtido foi subtraída a média dos C_t das amostras controles para

obter-se o valor de $-\Delta\Delta Ct$. O cálculo para obtenção do $-\Delta\Delta Ct$ foi portanto $(\text{med}Ct_{\text{endog}} - Ct_{\text{gene}}) = x; (x - Ct_{\text{spc}}) - \Delta = -\Delta\Delta C$.

3.3.4 Detecção da mutação JAK2V617F no sangue periférico

A detecção da mutação V617F do gene da JAK2 para exon 14 e 12 e a determinação da porcentagem de alelos mutados em pacientes positivos para mutação, foram realizadas em colaboração com laboratório de referência *Fleury Medicina e Saúde* e Profa. Dra. Maria de Lourdes Chauffaille da UNIFESP, em São Paulo, pela técnica de discriminação alélica utilizando PCR em tempo real (TOGNON, *et al.*, 2011 e 2015).

Cada ensaio de PCR incluiu um controle negativo. A porcentagem de alelos mutados foi estimada baseando-se no sinal fluorescente normalizado do alelo mutante (Rn_{mutante}) e do alelo selvagem (Rn_{selvagem}) localizado na região da amplificação exponencial, próximo ao ciclo de número 30 para a maioria das amostras, da PCR em tempo real e apresentados com porcentagem de mutação JAK2V617F ou negativo, como mostrado na equação abaixo:

$$\% \text{ mutação JAK2V617F} = Rn_{\text{mutante}} / (Rn_{\text{mutante}} + Rn_{\text{selvagem}})$$

3.3.5 Detecção da expressão de proteínas nas linhagens celulares HEL92.1.7, SET-2 e K562 por western-blotting

A expressão de proteínas avaliadas nos lisados protéicos das linhagens celulares HEL92.1.7, SET-2 e K562 submetidas ao tratamento de inibição farmacológica, foram:

- a) STAT e p-STAT para verificar a inibição da via JAK-STAT pelo JAK Inhibitor I;
- b) AKT e p-AKT para verificar a inibição da via AKT pelo inibidor de AKT1/2;

c) EIF4e para verificar se a inibição das vias JAK-STAT e AKT influenciou na ativação da via mTORC1 e expressão dessa proteína.

A quantificação das proteínas no lisado proteico, empregado nos ensaios de *western-blot*, foi realizada utilizando-se o kit BCATMProteinAssay de acordo com instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific-Waltham, MA, USA). As proteínas na concentração de 20ug foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 8%, por 2 horas à 100 volts e transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) à 0.30 mA por duas horas. Após a transferência, as membranas foram coradas com ponceau para observação qualitativa das proteínas transferidas e, em seguida, as membranas foram bloqueadas por incubação em tampão TBS Tween (4.84g Tris, 16g NaCl, pH 7,6;0,1% Tween; Sigma, St Louis, Missouri, USA) acrescido de 5% de albumina bovina (BSA, Cod A7906, Sigma, St Louis, Missouri, USA) e 0,01% de azida sódica, por 3 horas à temperatura ambiente (TA). Após esse período, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários de interesse nas diluições adequadas, por 12 horas (Tabela 7).

Após a retirada do anticorpo primário, as membranas foram lavadas com solução Tampão TBS-Tween (100mM Tris- HCl, 300mM NaCl e 1% tween 20) e incubadas com o anticorpo secundário (anti-mouse ou anti-rabbit) (Sigma –Aldrich, StLouis, EUA) conjugado à peroxidase (GE-Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK) na diluição 1:5000 em 5% de BSA em TBS-Tween 0,1%, por 1 hora, em temperatura ambiente. A detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência (Amersham ECL Plus[®], GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA). A proteína tubulina foi utilizada para a normalização das amostras.

Tabela 7: Especificidade, marca e tipo de anticorpos primários empregadas nos ensaios de *western-blot*, com as respectivas diluições.

Especificidade (PM)	Marca	Tipo	Diluição
STAT (90kDa)	CellSignaling	Monoclonal mouse	1:2000
p-STAT (90kDa)	CellSignaling	Policlonalrabbit	1:2000
AKT (60kDa)	CellSignaling	Policlonalrabbit	1:500
p-AKT (60kDa)	CellSignaling	Policlonalrabbit	1:1000
Eif4e (25kDa)	CellSignaling	Policlonalrabbit	1:1000

PM: peso molecular.

3.3.6 Análise estatística

Foram utilizados os testes estatísticos:

- a) Mann-Whitney para avaliar potenciais diferenças dos níveis de expressão dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular e da via e m-TOR entre controles e pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial, Mielofibrose;
- b) Kruskal- Wallis seguido de teste Dunn's para teste de comparação múltipla do nível de expressão do mesmo gene entre pacientes com TE, MF e PV;
- c) Mann-Whitney para determinar a diferença dos níveis de expressão dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular e da via e m-TOR pacientes com Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial, Mielofibrose JAK positivos e negativos (“status da mutação”);
- d) Sperman para avaliar a potencial correlação entre os níveis de expressão gênica e os parâmetros clinico-laboratorial dos pacientes.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad, Software Incorporated, Prism, versão 5.02

As diferenças entre os grupos estudados foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Detecção da mutação JAK2V617F em leucócitos de sangue periférico e porcentagem de alelos mutados

Foram analisadas 103 amostras de pacientes com NMP procedentes do biobanco do laboratório de Hematologia da FCFRP-USP e de novas colheitas. Dentre as amostras analisadas, 61 pacientes foram positivos para a mutação JAK2V617F (76,5% dos pacientes com PV, 49% dos pacientes com TE e 55% dos pacientes com MF).

As porcentagens de alelos mutados dos pacientes foram calculadas e estão relatadas nas tabelas de 1 a 3.

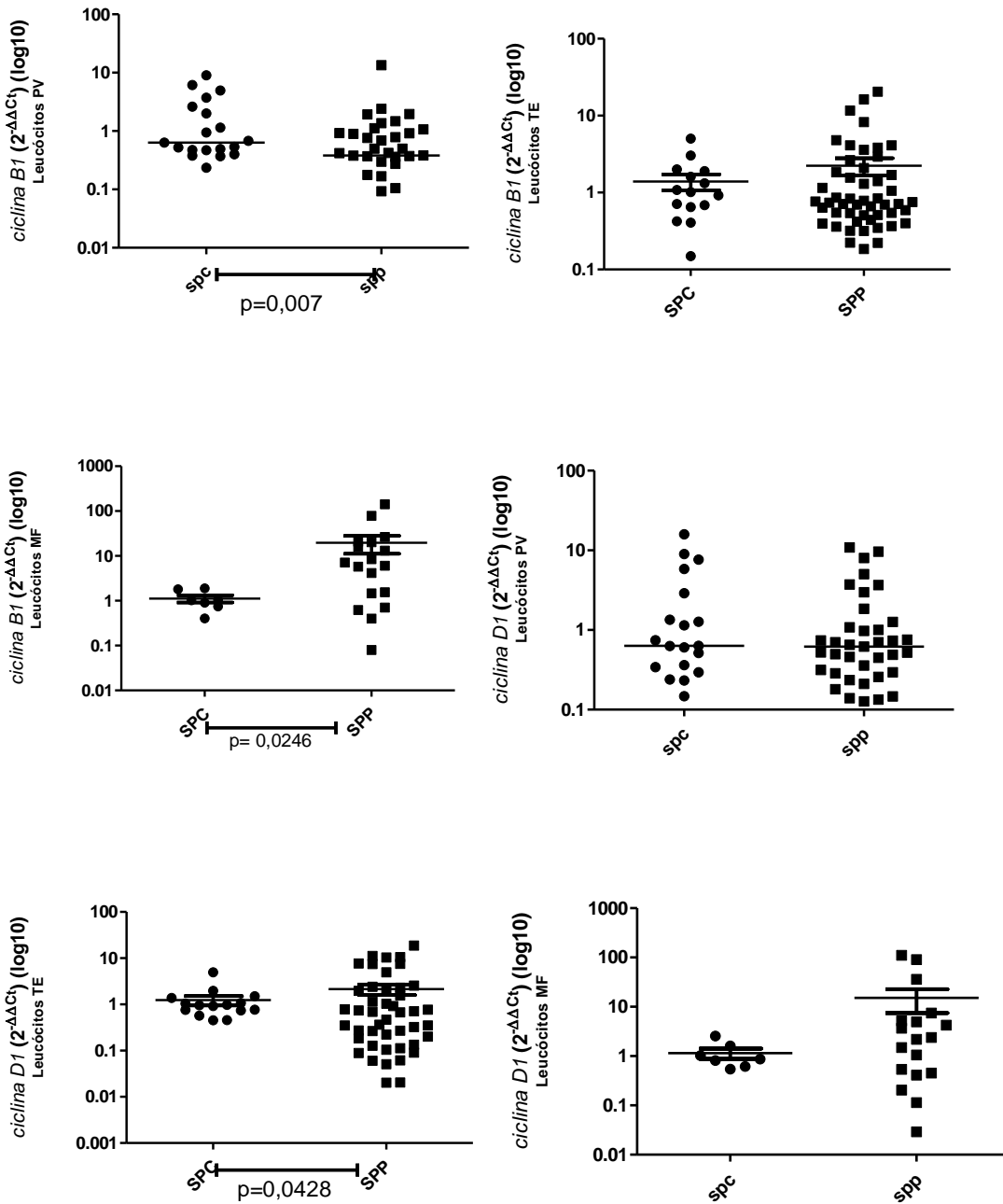
4.2 Quantificação da expressão gênica em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (PV, TE, MF)

4.2.1 Níveis de expressão dos genes reguladores do ciclo celular *CDK2*, *CDK4*, *P21*, *P27*, *CICLINAS B1*, *E* e *D1* em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas

A análise dos níveis de expressão gênica das ciclinas *B1*, *D1* e *E*, das ciclinas quinases dependentes (cdKs) *CDK 2* e *CDK 4* e *P21* e *P27* foi realizada em 34 amostras de leucócitos de pacientes com PV, 50 com TE, 18 com MF e 52 amostras de controle.

Foram observadas diferenças na mediana (med) da expressão entre as amostras de pacientes e seus respectivos controles para os genes: *ciclina B1* diminuída em PV e aumentada em MF (PV $p=0,007$; med= 0,380, MF $p=0,024$; med= 6,589 e controles med= 0,633 e med= 1,021, respectivamente); *ciclina D1* diminuída em TE (TE $p=0,042$; med=

0,415 e controle med= 0,959) e ciclina E1 diminuída em pacientes com PV (PV p=0,022; med= 0,922 e controle med= 2,514) (Figura 4).



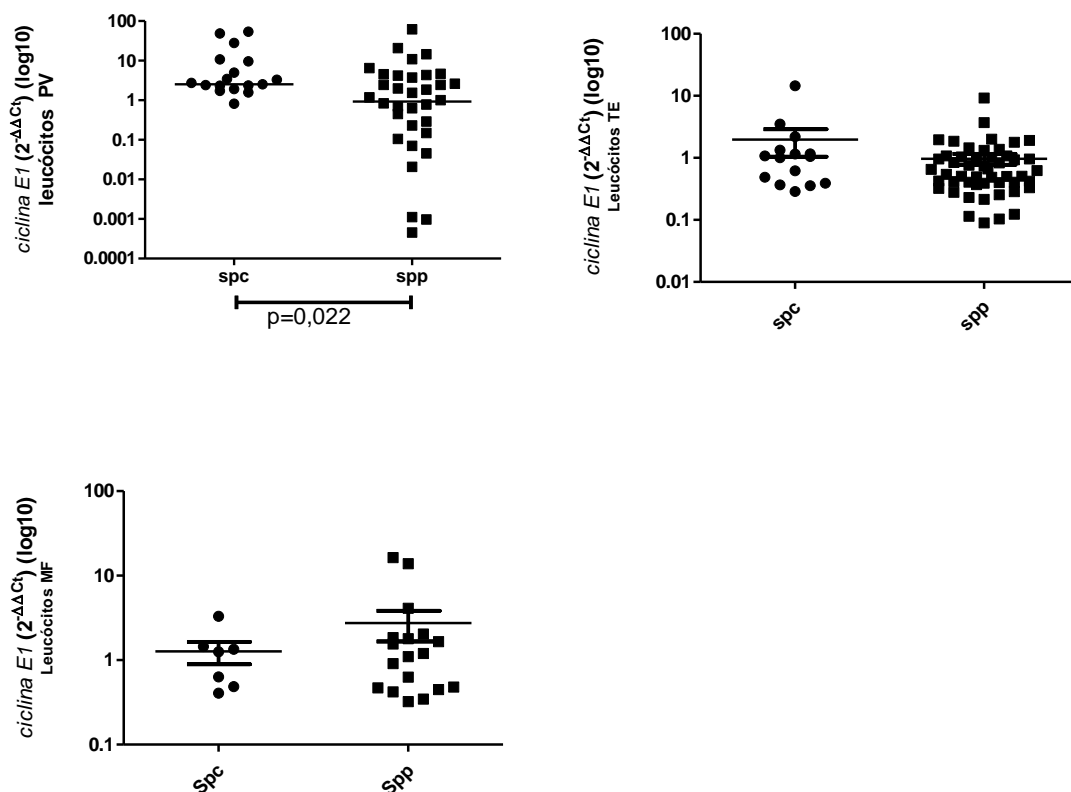


Figura 4. Expressão gênica das ciclinas *B1*, *E1* e *D1* em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas. Há menor expressão das ciclinas *B1* e *E1* em PV e *D1* em TE e aumento da expressão da ciclina *B1* em MF. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico Mann-Whitney.

Com relação à expressão dos genes *P27* e *P21*, apenas os pacientes com TE apresentaram alteração significativa na expressão quando comparados aos dados de expressão gênica do grupo controle. Foi observada expressão diminuída dos genes *P27* ($p=0,0002$, med= 0,220, controle med= 0,929) e *P21* ($p=0,0261$, m= 1,264 e controle m= 3,175) (Figura 5).

Os pacientes com Policitemia Vera e Mielofibrose Primária não apresentaram alterações na expressão dos genes *P27* e *P21* quando comparados aos respectivos controles.

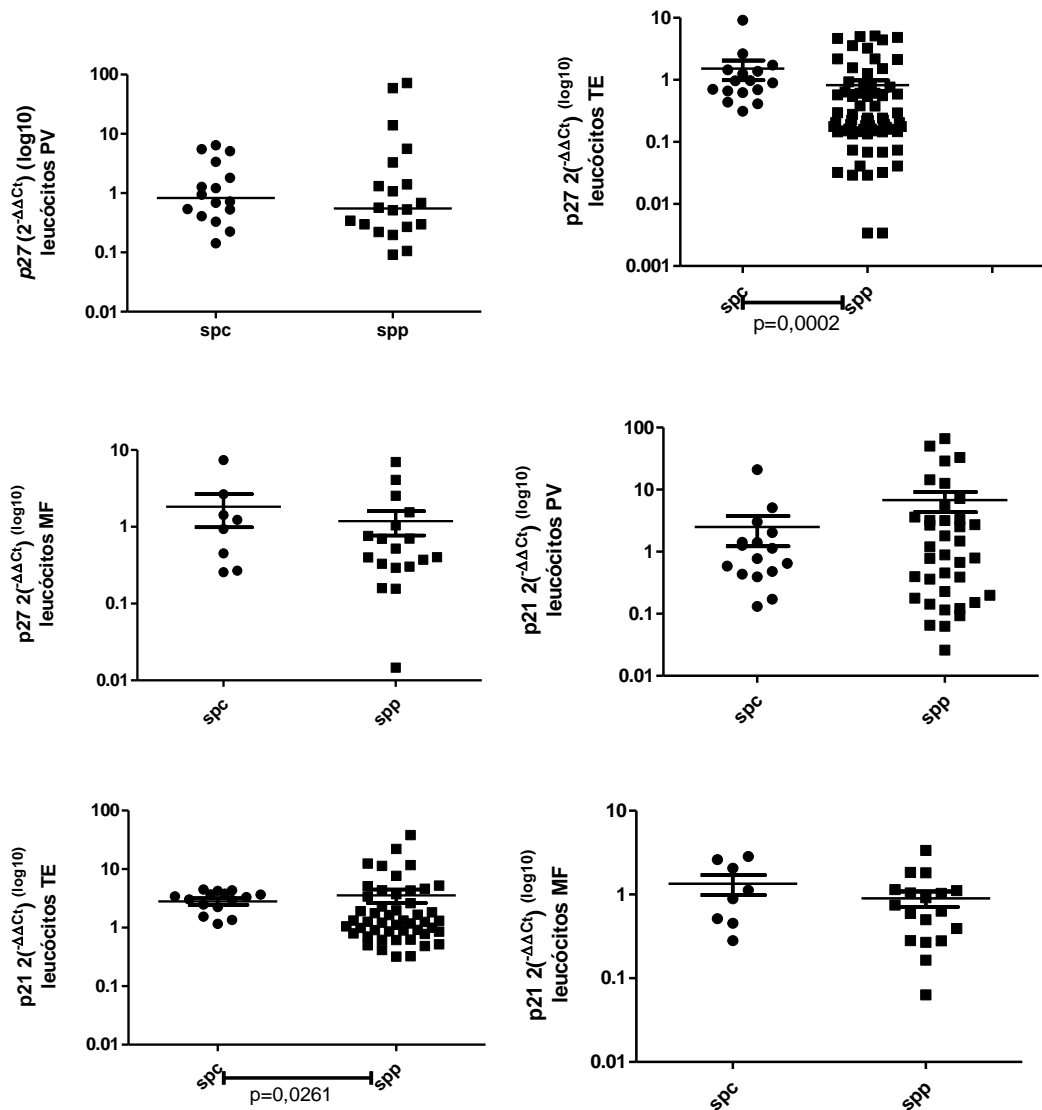


Fig.5: Expressão dos genes *P21* e *P27* em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas. Diminuição da expressão dos genes *P27* e *P21* em pacientes com Trombocitemia Essencial. Não houve alteração nos pacientes com Policitemia Vera e Mielofibrose Primária. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico Mann-Whitney.

Na análise de expressão dos genes *CDK2* e *CDK4*, foi observada menor expressão de *CDK2* em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial ($p=0,0367$; med=0,489) e maior expressão de *CDK4* em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera ($p=0,0133$; med=0,260) do que no grupo controle (med=0,822 e med=0,643, respectivamente) (Figura 6). A expressão de *CDK2* e *CDK4* não apresentou alteração em pacientes com Mielofibrose

Primária, assim como a expressão de *CDK2* em pacientes com PV e *CDK4* em pacientes com TE.

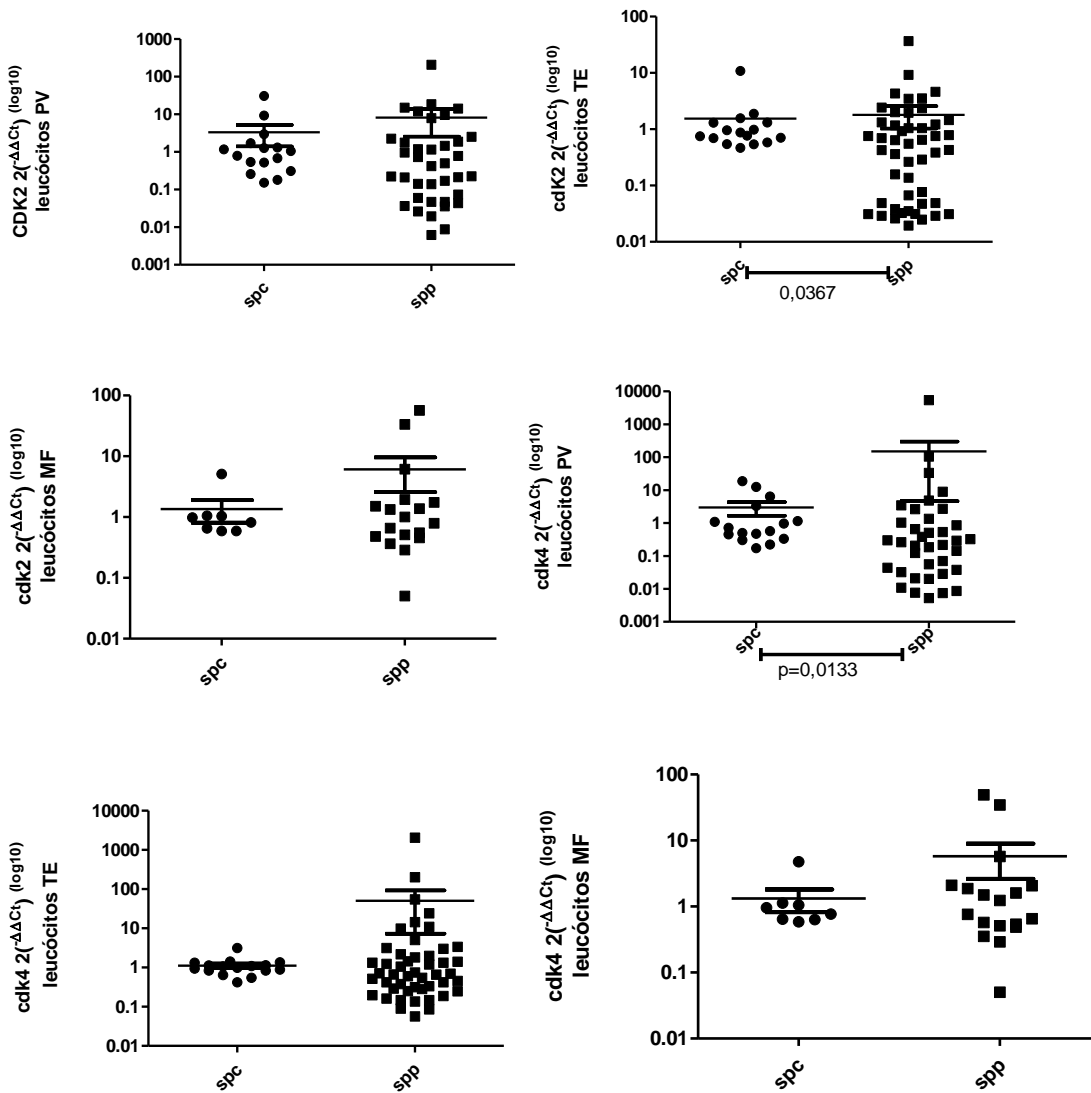


Fig. 6: Expressão dos genes *CDK2* e *CDK4* em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas. Há menor expressão dos genes *CDK2* e *CDK4* em pacientes com Trombocitemia Essencial e Policitemia Vera, respectivamente. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico de Mann-Whitney.

4.2.2 Expressão dos genes reguladores da via m-TOR em leucócitos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas

A análise dos níveis de expressão dos genes da via mTORC1 foi realizada em 32 amostras de leucócitos de pacientes com PV, 51 com TE, 17 com MF e 52 amostras de controle.

Pacientes com Trombocitemia Essencial expressam mais os genes *RPS6KB* ($p < 0,0001$; med=1,188) e *EIF4E* ($p = 0,029$; med= 0,262) em relação aos respectivos controles (med= 0,235 e 0,211). Os genes *EIF4EBP*, *m-TOR* e *RPTOR* não apresentaram diferença significativa de expressão entre pacientes com TE ($p = 0,253$; $p = 0,167$; $p = 0,099$, respectivamente) e controles (Figura7).

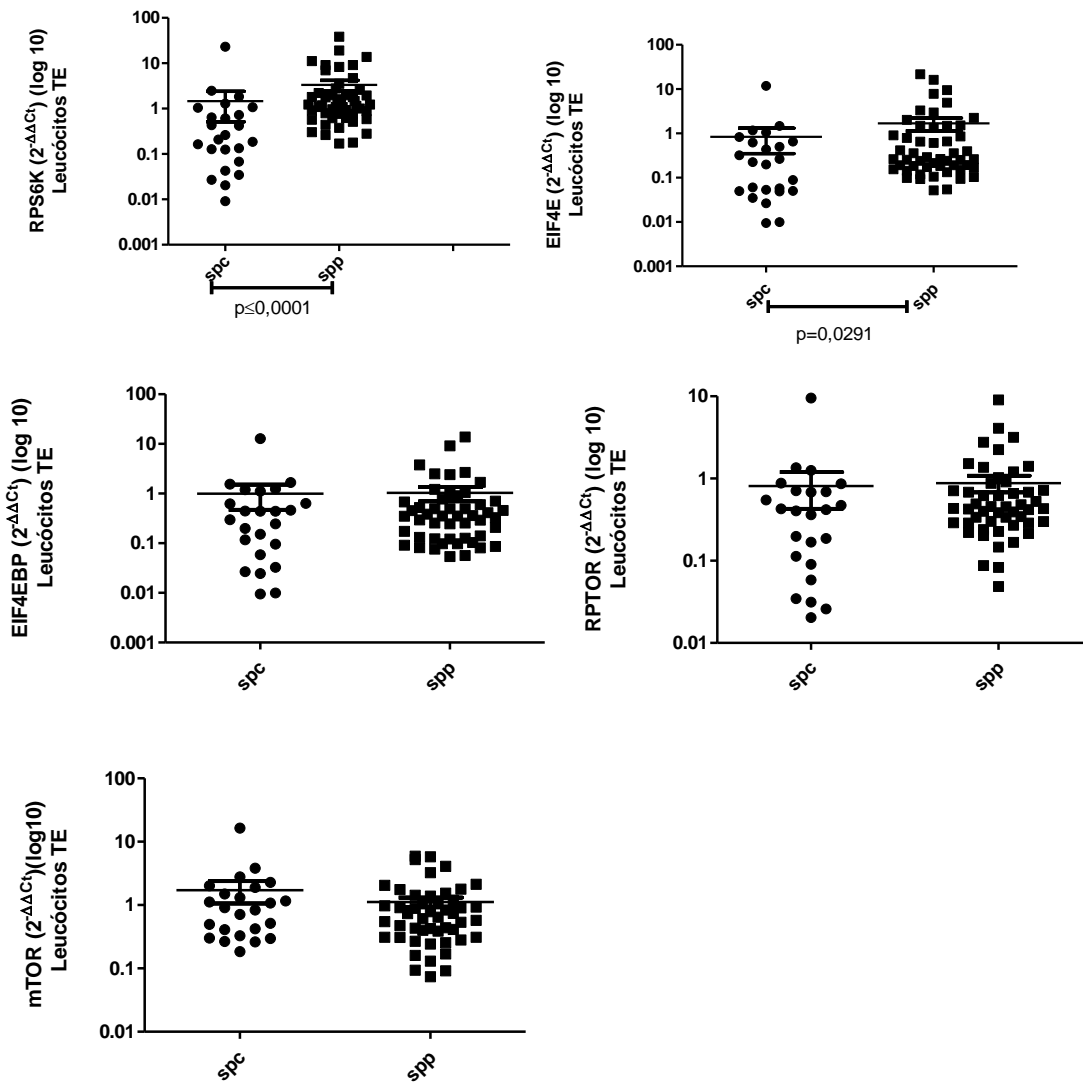
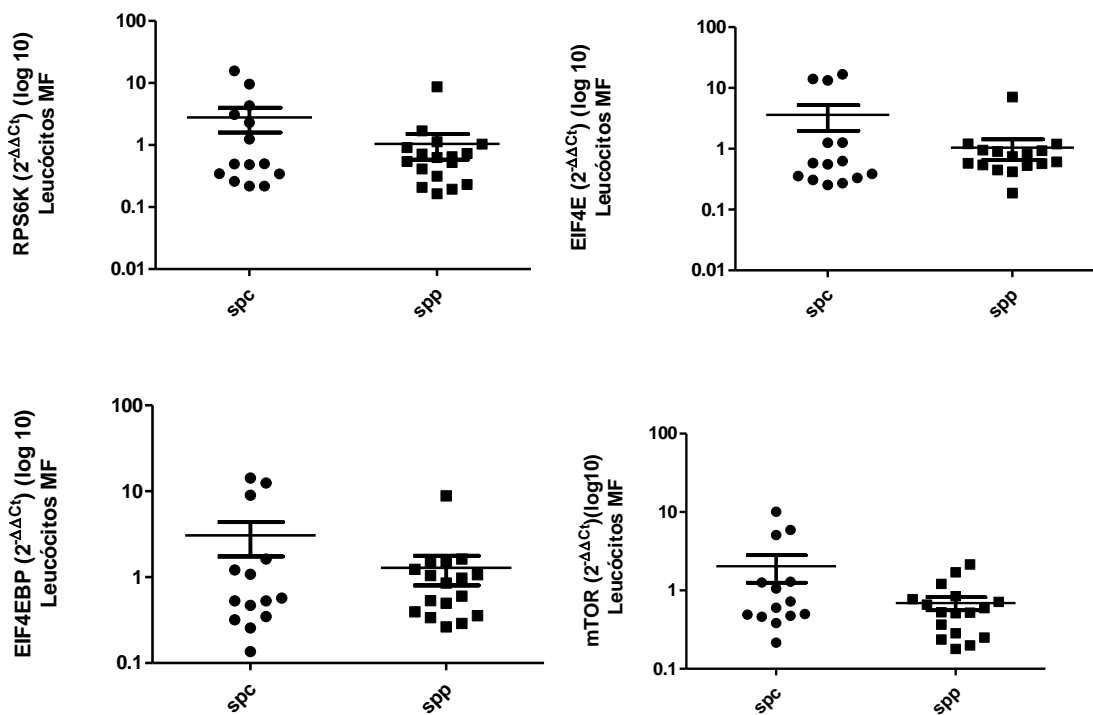


Fig.7: Expressão dos genes da via m-TOR em leucócitos de pacientes com TrombocitemiaEssencial. Há maior expressão dos genes *RPS6K* e *eIF4E* em pacientes com Trombocitemia Essencial. Os genes *RpTOR*, *EIF4EBP* e *mTOR* não apresentaram alteração de expressão nos pacientes com TE analisados em relação aos controles. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico de Mann-Whitney.

Nas análises das expressões dos genes da via m-TOR em leucócitos de MF houve alteração significativa na expressão do gene *RPTOR* ($p= 0,0498$), que se encontra menos exposto nos pacientes (med= 0,416) em relação aos controles (med= 0,651), enquanto os genes *RPS6KB*, *eIF4E*, *EIF4EBP* e *m-TOR* não apresentaram alterações significantes ($p= 0,196$; $p= 0,492$; $p= 0,492$ e $p= 0,120$, respectivamente) (Figura 8).



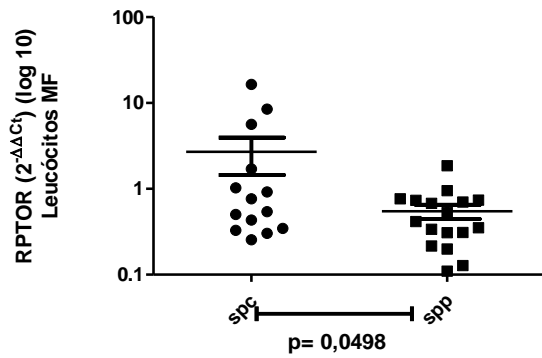
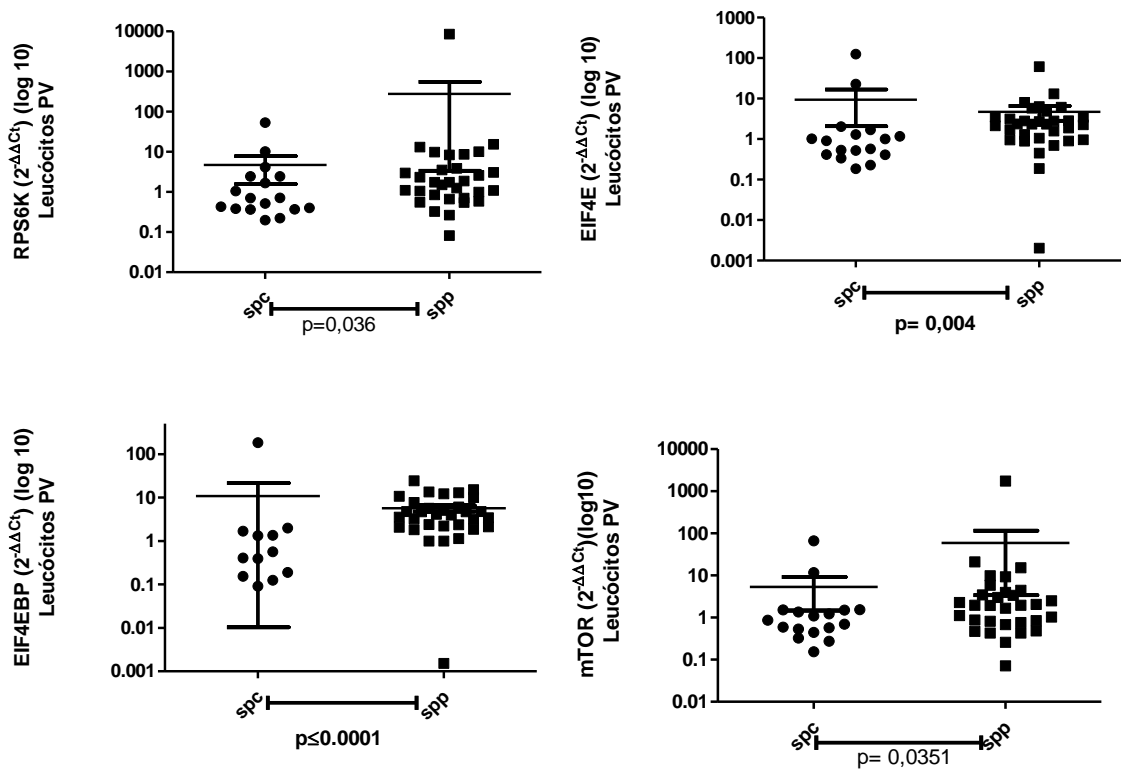


Fig.8: Expressão dos genes da via m-TOR em leucócitos de pacientes com Mielofibrose Primária. Diminuição da expressão do gene *RPTOR* em pacientes com Mielofibrose Primária e ausência de alteração na expressão dos genes *RPS6K*, *EIF4E*, *EIF4EBP* e *mTOR*. SPP (sangue periférico de pacientes), SPC (sangue periférico de controles), Mann Whitney test.

Em leucócitos de pacientes com PV, verificamos maior expressão dos genes *RPS6K* ($p= 0,036$; med= 1,7433), *EIF4E* ($p= 0,0042$; med= 2, 32), *EIF4EBP* ($p< 0,001$; med= 4,056) e *m-TOR* ($p= 0,035$; med= 1,952) em relação aos controles (med= 0,703; med= 0,902; med= 0,189 e med= 0,866) respectivamente. O gene *RPTOR* não apresentou alteração em seu nível de expressão ($p= 0,373$) (Figura 9).



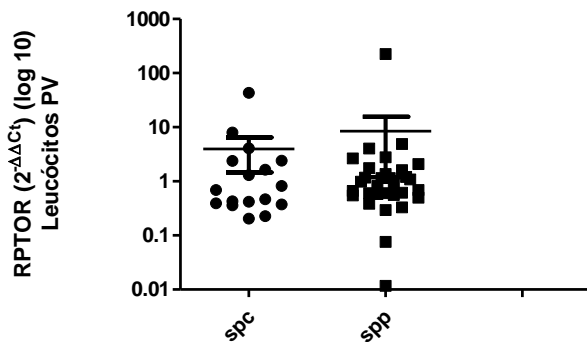


Fig.9: Expressão dos genes da via m-TOR em leucócitos de pacientes com Policitemia Vera e controles. Aumento da expressão dos genes *RPS6K*, *EIF4E*, *EIF4EBP* e *mTOR* em leucócitos de pacientes com PV, a expressão do gene *RPTOR* não está alterada em pacientes com PV em relação aos controles. SPP (sangue periférico de pacientes) e SPC (sangue periférico de controles), teste estatístico de Mann-Whitney.

4.2.3 Expressão dos genes *CDk2*, *CDk4*, *P21*, *P27*, ciclinas nas linhagens celulares HEL

92.1.7, SET-2 e K562 tratadas com os inibidores JAK Inibitor I e AKT^{1/2}

Nas tabelas 8, 9 e 10, estão apresentados os resultados de expressão gênica para os genes associados ao ciclo celular avaliados nas linhagens celulares pré- e pós-tratamento farmacológico com inibidores de JAK (JAK inibitor I-III) e AKT por 4, 8 e 24 horas, respectivamente nas linhagens SET-2, HEL 92.1.7 e K562. Os níveis de expressão gênica acima de 1 representam aumento de expressão do gene e os valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão gênica pós-tratamento.

Tabela 8: Expressão dos genes do ciclo celular na linhagem Set-2 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.

SET-2	<i>CICLINA</i>	<i>CICLINA</i>	<i>CICLINA</i>	<i>P27</i>	<i>P21</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK4</i>
	<i>B1</i>	<i>D1</i>	<i>E1</i>				
Ctrl	1	1	1	1	1	1	1
JAK II 4h	0,754	0,438	0,619	0,0003	0,0001	0,915	0,843
iAKT 1/2 4h	0,880	0,606	0,753	0,0002	0,0003	0,828	0,799

JAK II 8h	1,042	0,196	0,702	1,326	1,372	1.053	0,863
iAKT½ 8h	1,000	0,508	0,449	1,053	1,390	0,944	0,903
JAK II 24h	0,820	0,095	0,830	0,587	0,0009	1,136	1,160
iAKT ½ 24h	1,483	1,026	0,717	1,910	23,47	1.024	1,033

iAKT: inibidor de AKT ½, JAKII: JAK inibitor I.

Tabela 9: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem HEL92.1.7 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.

Hel 92.1.7	<i>CICLINA</i>	<i>CICLINA</i>	<i>CICLINA</i>	<i>P27</i>	<i>P21</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK4</i>
	<i>B1</i>	<i>D1</i>	<i>E1</i>				
Ctrl	1	1	1	1	1	1	1
JAK II 4h	1,585	0,719	0,983	1,377	1,372	1,258	1,356
iAKT1/2 4h	0,894	1,386	0,864	0.000	1,372	1,286	1,088
Jak II 8h	1,738	0,916	1,461	*10 ⁻⁶	*10 ⁻⁶	1,919	1,932
iAKT ½ 8h	2,203	4,956	1,871	2,074	*10 ⁻⁷	2,143	1,981
JAK II 24h	0,024	0,020	0,037	0,016	0,021	3,021	0,038
iAKT ½ 24h	1,887	4,063	2,096	0,666	0,000	0,043	2,884

iAKT: inibidor de AKT ½, JAKII: JAK inibitor I; *: não houve amplificação do gene, sendo considerado o CT 50 para o cálculo do fold change.

Tabela 10: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem K562 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.

K562	<i>CICLINA</i>	<i>CICLINA</i>	<i>CICLINA</i>	<i>P27</i>	<i>P21</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK4</i>
	<i>B1</i>	<i>D1</i>	<i>E1</i>				
Ctrl	1	1	1	1	1	1	1
JAK II 4h	1,068	0,524	0,733	0,995	0,652	0,702	0,810
iAKT 1/ 24h	0,874	0,450	0,633	0,851	1,629	0,829	0,804
Jak II 8h	1,344	1,677	1,313	1,622	1,968	1,519	1,435

iAKT ½ 8h	1,815	2,813	1,633	2,010	3,356	2,164	1,848
JAK II 24h	1,297	2,250	1,342	1,421	1,315	1,368	1,502
iAKT ½ 24h	0,695	0,651	0,744	0,788	0,738	0,580	0,873

iAKT: inibidor de AKT ½, JAK II: JAK inibitor II.

4.2.4 Níveis de expressão dos genes reguladores da via de sinalização mTORC1 nas linhagens celulares HEL 92.1.7, SET-2 e K562, tratadas com os inibidores JAK Inibitor I e de AKT 1/2

Nas tabelas 11, 12 e 13 estão apontados os resultados dos níveis de expressão gênica para os genes associados à via de sinalização mTORC1, nas linhagens SET-2, HEL 92.1.7 e K562, respectivamente, pós-tratamento farmacológico.

Tabela 11: Níveis de expressão dos genes da via mTOR na linhagem SET-2 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.

Set-2	<i>RPS6K</i>	<i>EIF4E</i>	<i>EIF4EBP</i>	<i>RPTOR</i>	<i>m-TOR</i>
Ctrl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
JAK II 4h	0,817	0,751	0,902	0,941	0,923
i AKT 1/ 24h	0,863	0,932	0,716	1,201	0,865
JAK II 8h	0,673	0,694	0,854	0,909	0,779
i AKT ½ 8h	0,825	0,869	0,588	1,004	1,002
JAK II 24h	1,439	1,242	1,007	1,461	1,505
i AKT ½ 24h	1,382	0,985	0,853	1,114	1,076

iAKT: inibidor de AKT ½, JAK II: JAK inibitor II.

Tabela 12: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem HEL 92.1.7 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.

HEL 92.1.7	<i>RPS6K</i>	<i>EIF4E</i>	<i>EIF4EBP</i>	<i>RPTOR</i>	<i>m-TOR</i>
Ctrl	1	1	1	1	1

JAK II 4h	0,790	1,363	1,771	1,287	1,484
iAKT 1/ 24h	1,180	1,152	1,069	1,206	1,080
JAK II 8h	1,109	1,309	1,903	2,231	1,120
iAKT ½ 8h	2,255	1,906	2,080	2,563	1,635
JAK II 24h	0,030	0,032	0,033	0,048	0,030
iAKT ½ 24h	1,663	1,985	2,136	2,264	2,148

iAKT: inibidor de AKT ½, JAK II: JAK inibitor II.

Tabela 13: Níveis de expressão dos genes do ciclo celular na linhagem K562 após tratamento com inibidor de JAK 2 e AKT por 4h, 8h e 24h.

K562	<i>RPS6K</i>	<i>EIF4E</i>	<i>EIF4EBP</i>	<i>RPTOR</i>	<i>m-TOR</i>
Ctrl	1	1	1	1	1
JAK II 4h	0,594	0,656	0,789	0,726	0,649
iAKT 1/ 24h	0,699	0,795	0,794	0,778	0,798
JAK II 8h	1,070	1,575	2,017	1,645	1,386
iAKT ½ 8h	1,603	2,063	1,844	1,934	1,882
JAK II 24h	1,633	1,537	1,528	1,535	1,202
iAKT ½ 24h	0,737	0,759	0,638	0,767	0,758

iAKT: inibidor de AKT ½, JAK II: JAK inibitor II.

4.2.5 Expressão proteica dos substratos das vias AKT, STAT e molécula eIF4E

Ainibição das vias JAK-STAT e AKT nas linhagens celulares HEL.92.1.7 e SET-2 foi realizada, com o tratamento farmacológico com os inibidores JAK inibitor I (JII-

inibidor da via JAK2) e de AKT 1/2, com o objetivo de observar a potencial modulação da expressão de eIF4E pelas vias JAK-STAT e AKT.

eIF4E é uma molécula da via m-TOR, envolvida na progressão do ciclo celular e resistência a apoptose, cuja desregulação está associada a patogênese de inúmeros tipos de câncer.(REYAZ *et al.*, 2016)

A inibição das vias foi verificada pela detecção da diminuição da fração fosforilada das proteínas STAT e AKT (p-STAT e p-AKT).

Nas figuras 10 e 11, verifica-se a inibição da via JAK/STAT nos tempos de 4, 8 e 24h nas linhagens SET-2 e HEL 92.7.1, pela observação da diminuição da fração proteica de p-STAT5, em comparação com as amostras controle. A inibição da via AKT foi confirmada nos tempos 8 e 24h, pela detecção da diminuição da fração p-AKT em comparação com as amostras controle.

Ocorreu inibição da via JAK/STAT, no tempo de 24h, na linhagem K562, confirmados pela diminuição da fração proteica de p-STAT5, em comparação com as amostras controle (Figura 12). A inibição da via AKT foi confirmada nos tempos 4 e 8h devido diminuição da fração p-AKT em comparação com as amostras controle.

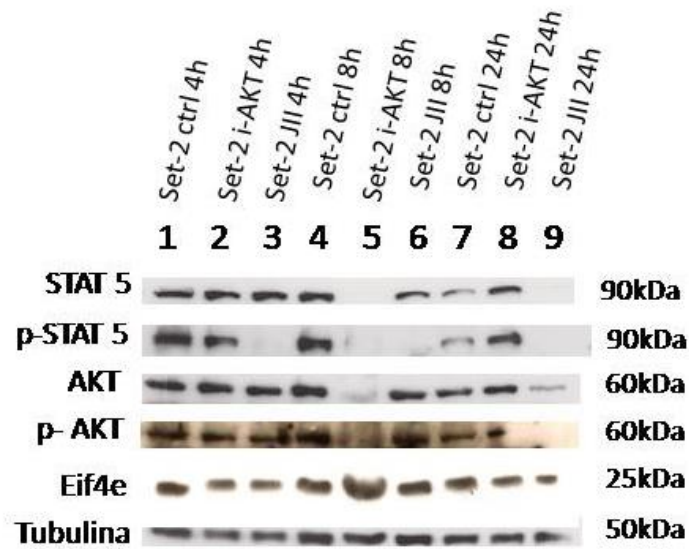


Fig. 10: Expressão proteica de STAT5, p-STAT-5, AKT, p-AKT, eIF4E e tubulina no lisado celular da linhagem Set-2 tratada com os inibidores das vias JAK-STAT e AKT. A linhagem SET-2 foi tratada com os inibidores JII e de AKT na concentração de 5uM durante 4h, 8h e 24h. Houve inibição da via JAK/STAT nos tempos de 4, 8 e 24h, inibição da via AKT nos tempos de 8 e 24h e inibição de Eif4e no tempo de 24h.

*ctrl: controle; i-AKT : inibidor de AKT; JII: inibidor de JAK 2.

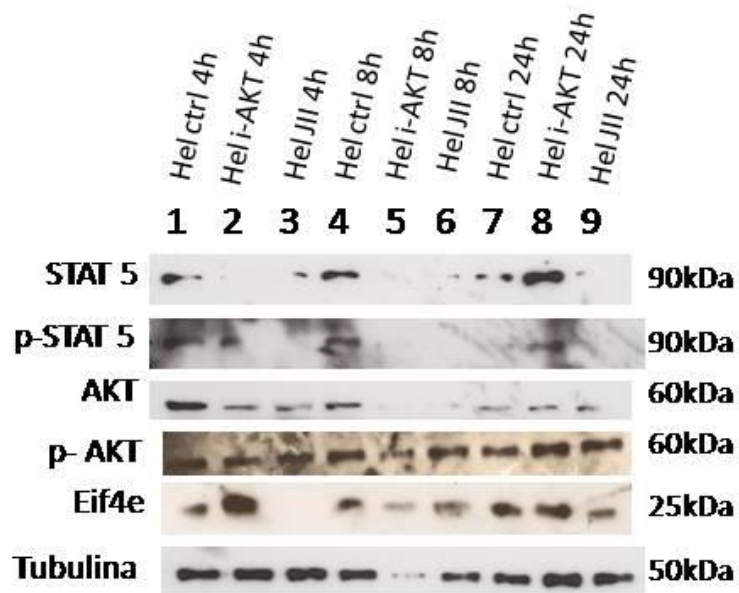


Fig.11: Expressão proteica de STAT5, p-STAT-5, AKT, p-AKT, eIF4E e tubulina no lisado celular da linhagem HEL.92.1.7 tratada com os inibidores das vias JAK-STAT e AKT. A linhagem HEL.92.1.7 foi tratada com os inibidores JII e de AKT na concentração de 5uM durante 4h, 8h e 24h. Houve inibição da via JAK/STAT nos tempos de 4, 8 e 24h, inibição da via AKT nos tempos de 8 e 24h e inibição de eIF4E nos tempos de 4, 8 e 24h para o tratamento com JII. *ctrl: controle; i-AKT : inibidor de AKT; JII: inibidor de JAK.

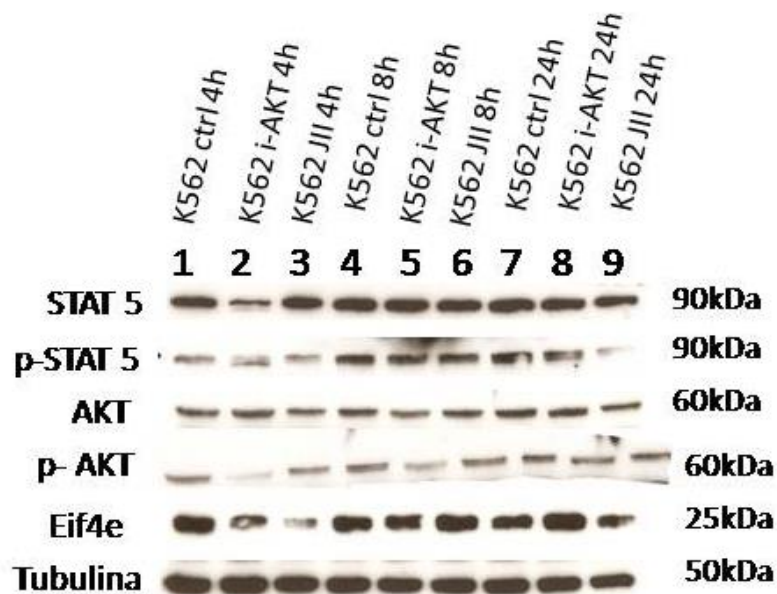


Fig.12: Expressão proteica de STAT5, p-STAT-5, AKT, p-AKT, eIF4E e tubulina no lisado celular da linhagem K562 tratada com os inibidores das vias JAK-STAT e AKT. A linhagem k562 foi tratada com os inibidores JII e de AKT na concentração de 5uM durante 4h, 8h e 24h. Houve inibição da via JAK/STAT nos tempos de 4 e 24h, inibição da via AKT nos tempos de 4, 8, e inibição de EIF4e para o tratamento de 4h com JII.

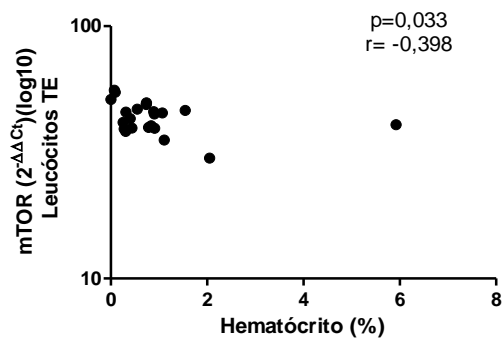
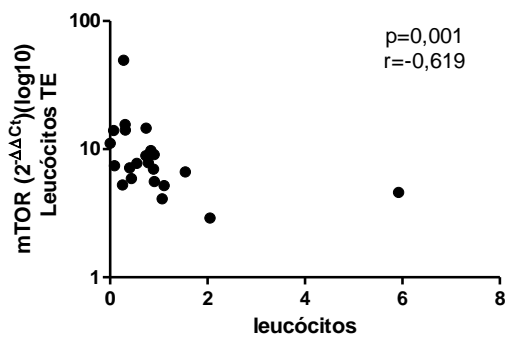
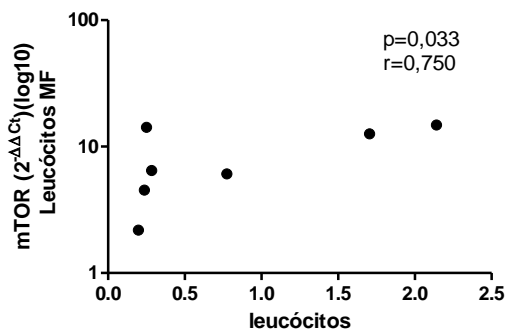
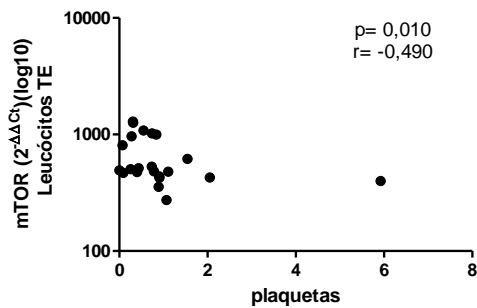
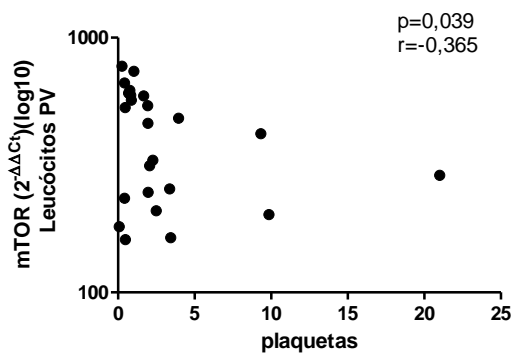
*ctrl: controle; i-AKT : inibidor de AKT; JII: inibidor de JAK.

4.2.6 Correlações entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR e os parâmetros clínicos laboratoriais dos pacientes com a mutação *JAK2V617F*

Os resultados das análises de potenciais correlações entre a expressão dos genes da via mTORC1 e os parâmetros clínico laboratoriais dos pacientes de Neoplasias Mieloproliferativas positivos para mutação *JAK2V617F* foram (Figura 13):

- correlação negativa entre os níveis de expressão do gene *mTOR* e o número de plaquetas nos pacientes com PV ($p=0,039$; $r=-0,365$),
- correlação negativa entre os níveis de expressão do gene *mTOR* e o número de plaquetas ($p=0,010$; $r=-0,490$), leucócitos ($p=0,001$; $r=-0,619$) e o índice hematócrito ($p=0,033$; $r=-0,398$) nos pacientes com TE;

- correlação positiva entre os níveis de expressão do gene *mTOR* e o número de leucócitos em pacientes com MF ($p=0,033$; $r=0,750$);
- correlação negativa entre os níveis de expressão do gene *RPTOR* com o número de leucócitos em paciente com TE ($p=0,002$; $r=-0,579$);
- correlação positiva entre os níveis de expressão do gene *EIF4EBP* com o número de leucócitos em pacientes com MF ($p=0,044$; $r=0,714$). (Figura 13).



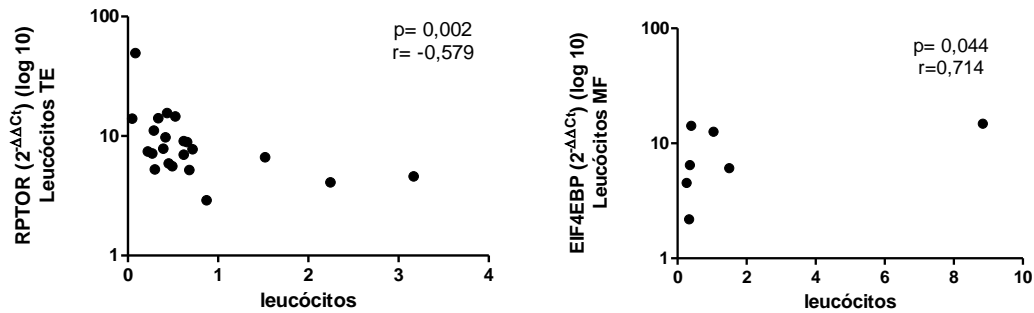


Fig.13: Correlação entre a expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e os parâmetros clínico-laboratoriais. Houve correlação negativa entre o gene *mTOR* e o número de plaquetas nos pacientes com PV e TE; entre o gene *mTOR* e o número de leucócitos e o índice hematócrito em TE; entre *RPTOR* e o número de leucócitos em TE; entre *EIF4EBP* e o número de leucócitos de MF e correlação positiva entre mTOR e o número de leucócitos em MF. Teste estatístico de Spermann.

4.2.7 Correlações não significativas entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR, e os dados relativos aos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas com a mutação JAK2V617F

A tabela 14 apresenta os valores de 'p' para as análises em que as correlações não foram significativas entre os genes da via mTORC1 e os parâmetros clínico laboratoriais e porcentagem de alelos mutados dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (TE, MF e PV).

Tabela 14: Valores de (p) para correlações não significativas entre os genes associados à via mTORC1, os parâmetros clinico-laboratoriais e a porcentagem de alelos mutados.

Correlação	Hemoglobina	Hematócrito	Plaquetas	Leucócitos	% alelos
Gene/parâmetro	g/dL	%	$\times 10^3$	$\times 10^3$	Mutados
clinico					JAK2
<i>EIF4E</i> PV	p=0,378	p=0,404	p=0,373	p=0,257	p=0,416
<i>EIF4EBP</i> PV	p=0,226	p=0,231	p=0,334	p=0,411	p=0,350
<i>RPTOR</i> PV	p=0,467	p=0,378	p=0,242	p=0,461	p=0,478
<i>RPS6K</i> PV	p=0,081	p=0,127	p=0,479	p=0,416	p=0,288
<i>MTOR</i> PV	p=0,054	p=0,068	-----	p=0,372	p=0,336
<i>EIF4E</i> TE	p=0,266	p=0,218	p=0,149	p=0,340	p=0,441
<i>EIF4EBP</i> TE	p=0,352	p=0,455	p=0,325	p=0,400	p=0,315
<i>RPTOR</i> TE	p=0,268	p=0,217	p=0,064	-----	-----
<i>RPS6K</i> TE	p=0,122	p=0,132	p=0,144	p=0,081	p=0,099
<i>MTOR</i> TE	p=0,071	-----	-----	-----	-----
<i>EIF4E</i> MF	p=0,268	p=0,268	p=0,108	p=0,066	p=0,441
<i>EIF4EBP</i> MF	p=0,197	p=0,197	p=0,330	-----	p=0,419
<i>RPTOR</i> MF	p=0,453	p=0,454	p=0,356	p=0,330	p=0,197
<i>RPS6K</i> MF	p=0,100	p=0,091	p=0,252	p=0,255	p=0,427
<i>MTOR</i> MF	p=0,100	p=0,100	p=0,453	-----	p=0,297

4.2.8 Correlações entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR e porcentagem de alelos mutados em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.

A correlação entre a expressão dos genes da via mTORC1 e a porcentagem de alelos mutados JAK2V617F foi negativa para os genes *mTOR* e *RPTOR* em pacientes com TE (Figura 14). Os demais genes analisados não apresentaram resultados significativos e estão relatados na tabela 14.

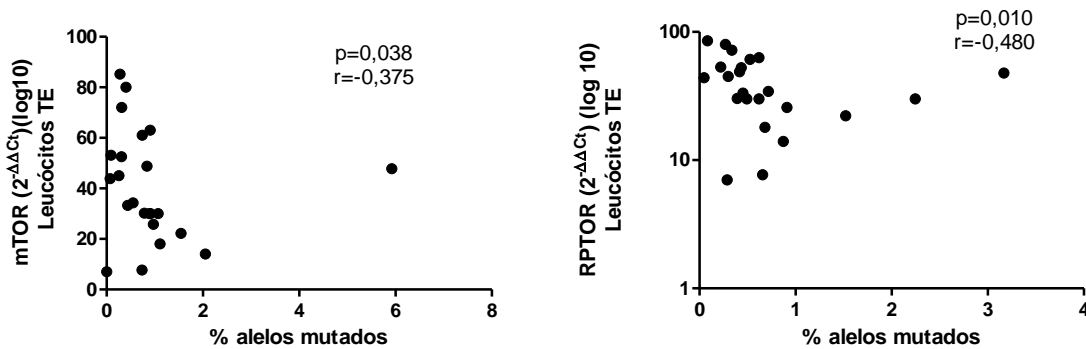


Fig.14: Correlação entre a expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e a porcentagem de alelos mutados. Correlação negativa entre os genes *mTOR* e *RPTOR* e a porcentagem de alelos mutados em pacientes com TE. Teste estatístico de Spermann.

4.2.9 Comparação entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR e as Neoplasias Mieloproliferativas (PV, TE e MF)

Houve diferença significativa para a expressão dos genes associados à via mTORC1 entre as Neoplasias Mieloproliferativas. Foi observado maior expressão de *RPS6K* em TE e PV, na comparação com MF [TE vs MF (**) e MF vs PV (**)] ($p=0,001$); maior expressão de *eIF4E* em PV quando comparado a TE e MF [TE vs PV (***) e MF vs PV (*)] ($p < 0,0001$); maior expressão de *EIFBEBP* nos pacientes com PV quando comparado aos

pacientes com TE e MF [TE vs PV (***) e MF vs PV (**)] ($p < 0,0001$) *mTOR* apresentou maior expressão nos pacientes com PV quando comparado aos pacientes com TE e MF [TE vs PV (**) e MF vs PV (**)] ($p = 0,0003$) e maior expressão de *RPTOR* nos pacientes com PV quando comparado aos de TE e MF [TE vs PV (**) e MF vs PV (*)] ($p = 0,005$) (Figura 15).

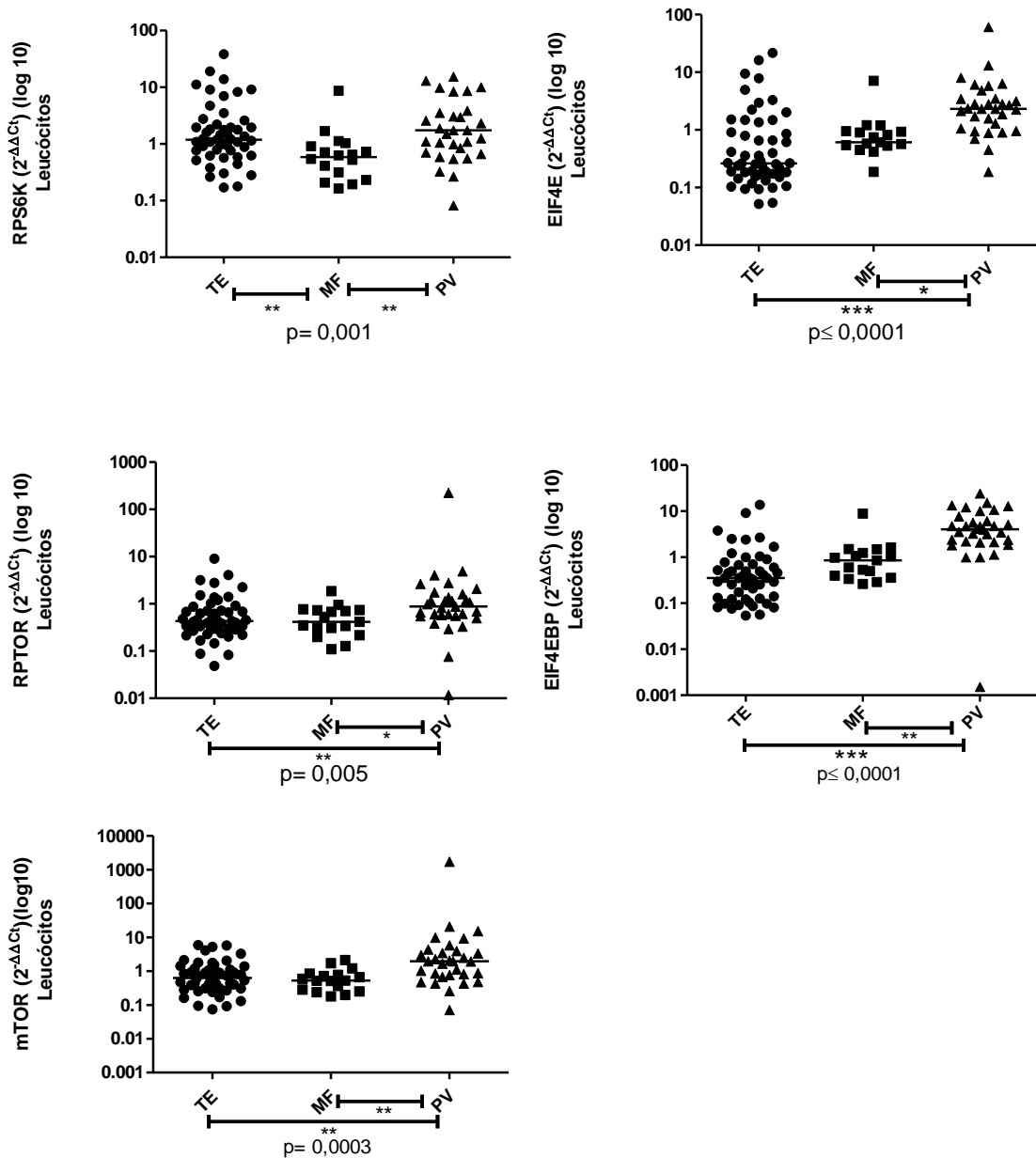


Fig.15: Correlação da expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 entre as Neoplasias Mieloproliferativas (TE, MF e PV). Correlações significativas para os genes *EIF4E*, *EIF4EBP*, *mTOR* e *RPTOR* entre TE vs PV e MF vs PV e entre TE vs MF e MF vs PV para o gene *RPS6K*. Teste estatístico 1way Anova (Kruskal- Wallis e Dunn's).

4.2.10 Comparação entre os níveis de expressão dos genes do ciclo celular nas Neoplasias Mieloproliferativas (PV, TE e MF)

Houve diferença significativa na expressão dos genes associados ao ciclo celular entre as Neoplasias Mieloproliferativas. Foi observada maior expressão do gene *p21* em pacientes com TE quando comparado aos pacientes com MF (*) ($p=0,024$), maior expressão do gene *CDK4* em PV quando comparado a TE (*) e MF (*) ($p=0,065$), maior expressão de *ciclina D1* nos pacientes com MF quando comparado aos pacientes com TE (*) ($p=0,043$) e maior expressão de *ciclina B1* em MF quando comparado a TE (**) e PV (**) ($p<0,0001$).

As neoplasias Mieloproliferativas TE, PV e MF apresentaram perfil semelhante na expressão de *p21*, *CDK2* e *ciclina E1*, uma vez que não foi observada diferença de expressão quando comparadas (Figura 16).

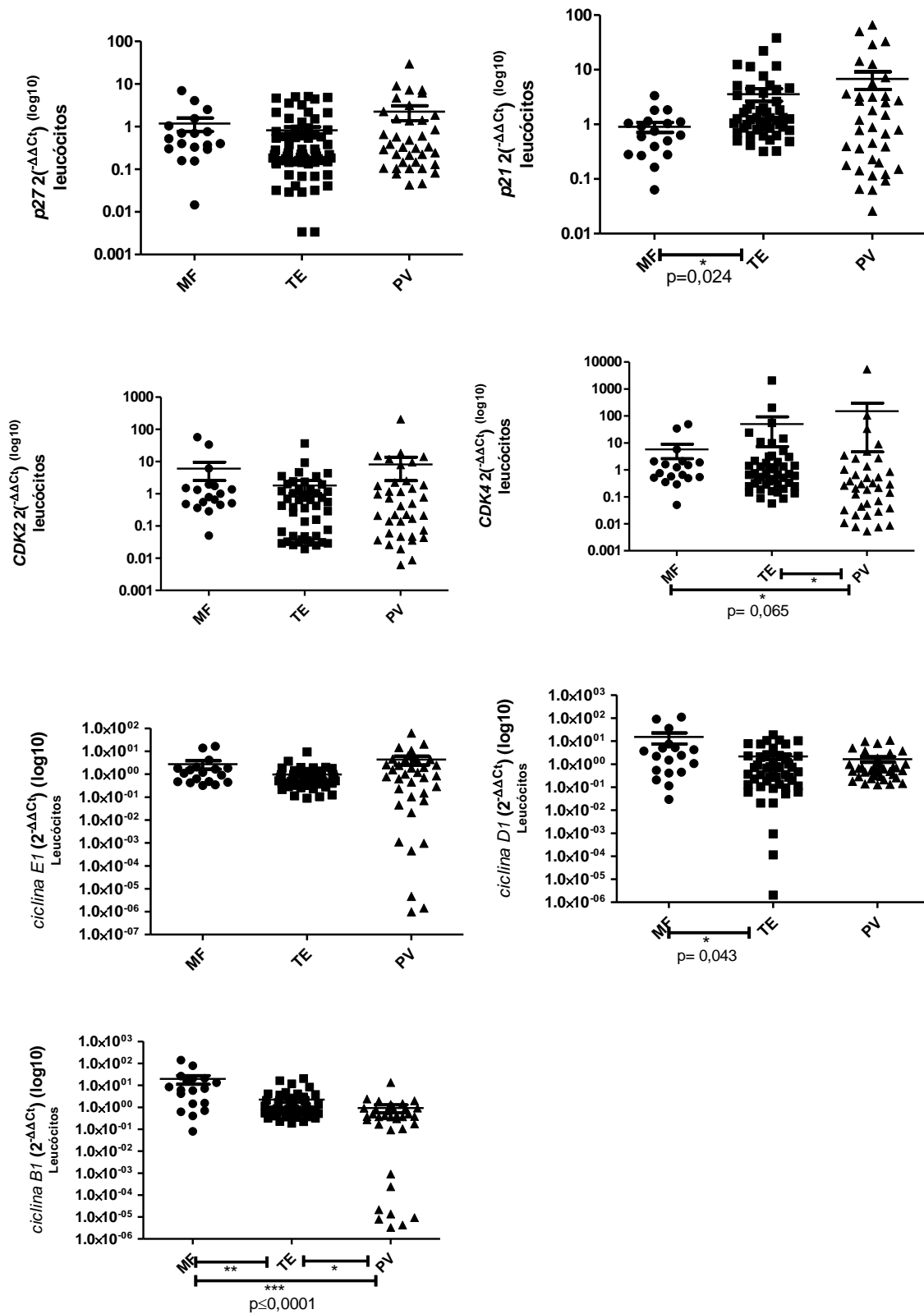
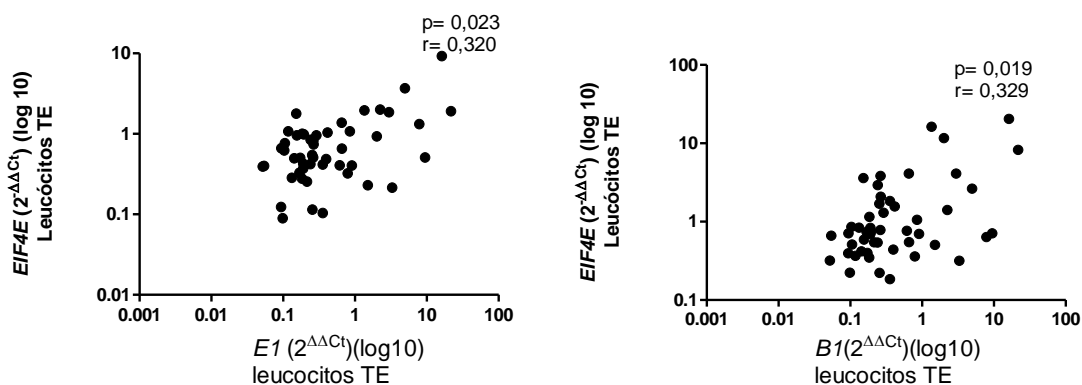
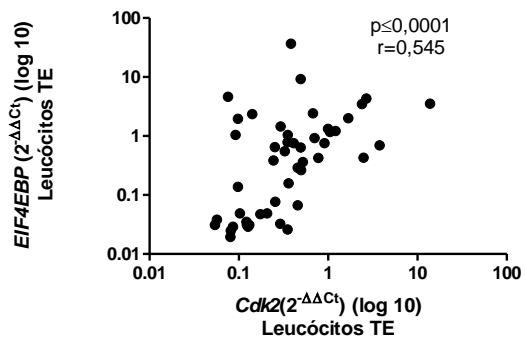
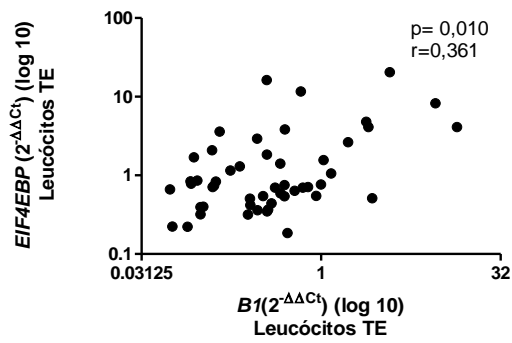
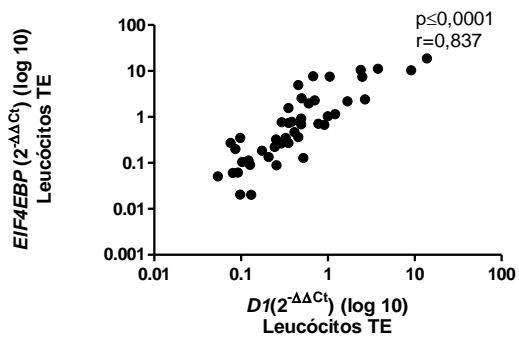
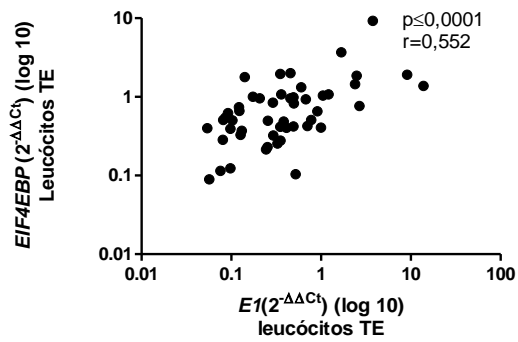
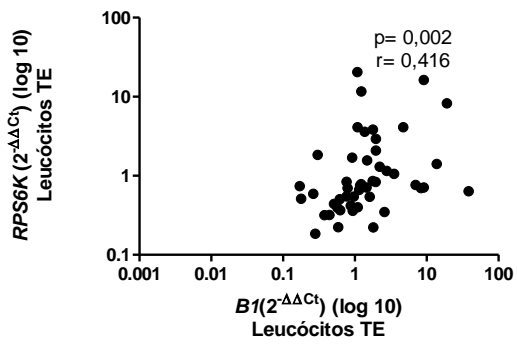
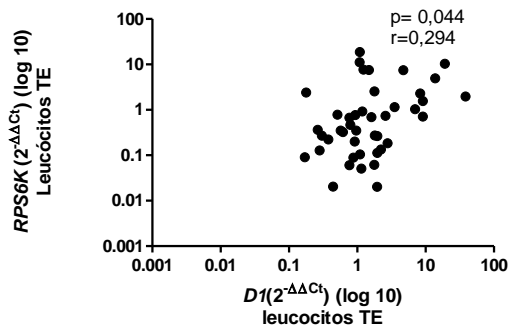
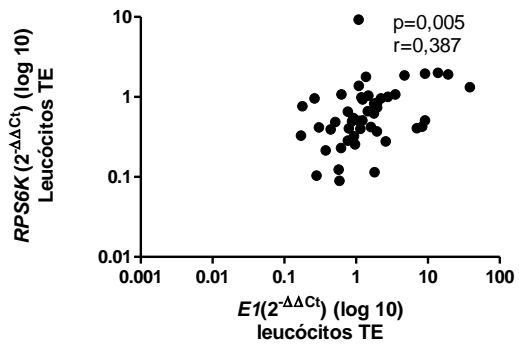
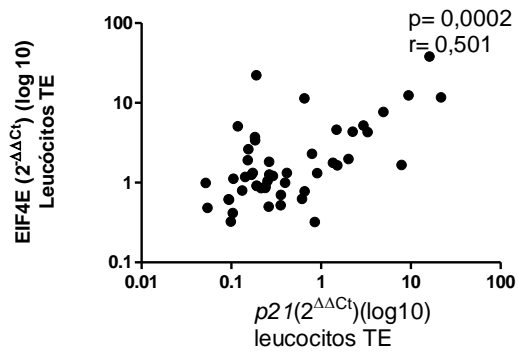


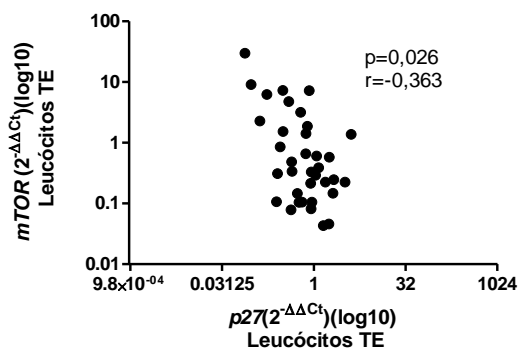
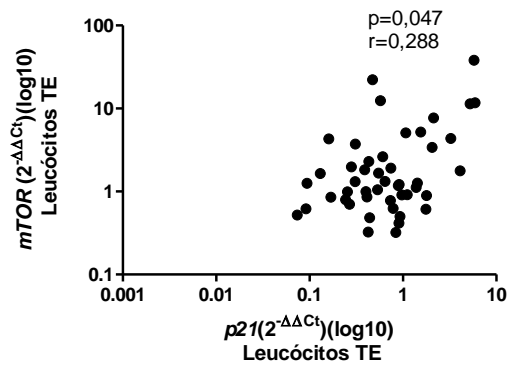
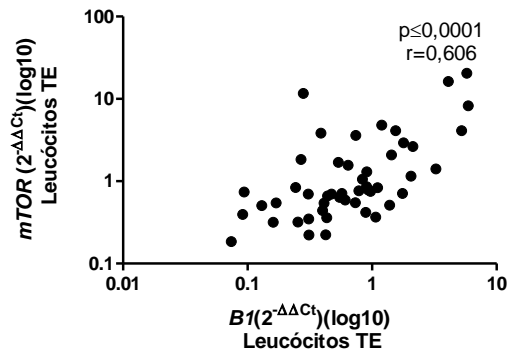
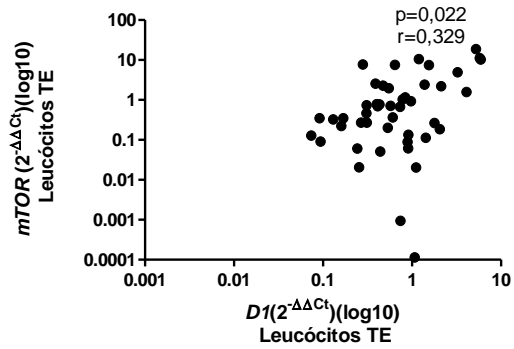
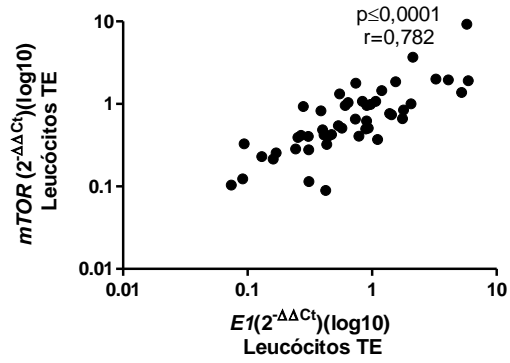
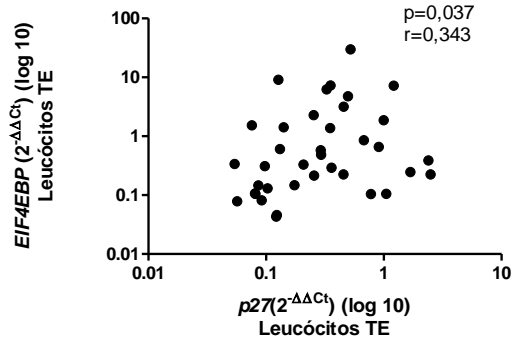
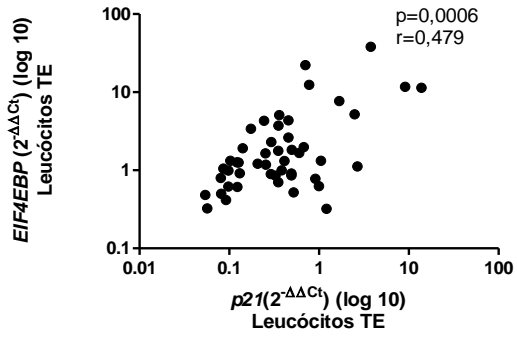
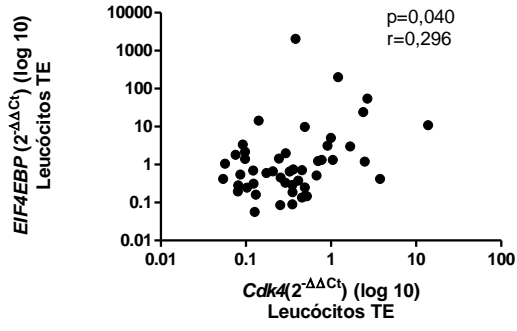
Fig.16: Comparação da expressão dos genes envolvidos no ciclo celular entre as Neoplasias Mieloproliferativas (MF, TE e PV). Comparações significativas para a expressão dos genes *p21* entre MF vs TE, *CDK4* entre MF vs PV e TE vs PV, *ciclina D1* entre MF vs TE e *ciclina B1* entre MF vs TE, MF vs PV e TE vs PV. Teste estatístico oneway Anova (Kruskal- Wallis e Dunn's).

4.2.11 Correlações entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR e os genes associados ao ciclo celular em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (TE, MF e PV)

Os resultados indicam correlações positivas nos pacientes de TE, dos níveis de expressão dos genes *EIF4E* e ciclina *E1*, *B1* e *P21* ($p= 0,023$; $0,019$ e $0,0002$, respectivamente) e ($r= 0,320$; $0,329$ e $0,501$, respectivamente); do gene *RPS6K* entre os genes ciclina *E1*, *D1* e *B1* ($p= 0,005$; $0,044$ e $0,002$; respectivamente) e ($r=0,387$; $0,294$ e $0,416$; respectivamente); do gene *EIF4EBP* e os genes associados ao ciclo celular: *CICLINA E1* ($p<0,0001$; $r=0,782$), *CICLINA D1* ($p<0,0001$; $r=0,837$), *CICLINA B1* ($p=0,010$; $r=0,361$), *CDK2* ($p<0,0001$; $r=0,545$), *CDK4* ($p=0,040$; $r=0,296$), *p21* ($p=0,0006$; $r=0,479$) e *P27* ($p=0,037$; $r=0,343$); do gene *MTOR* com os genes *CICLINA E1* ($p<0,0001$; $r=0,782$), *CICLINA D1* ($p=0,022$; $r= 0,329$), *CICLINAB1* ($p<0,0001$; $r=0,606$), *P21* ($p=0,047$; $r=0,288$) e *P27* ($p=0,026$; $r=0,363$); do gene *RPTOR* com os genes *CICLINA E1* ($p<0,0001$; $r=0,766$), *CICLINA B1* ($p=0,0008$; $r=0,458$) e *P21* ($p=0,007$; $r=0,382$) (Figura 17).







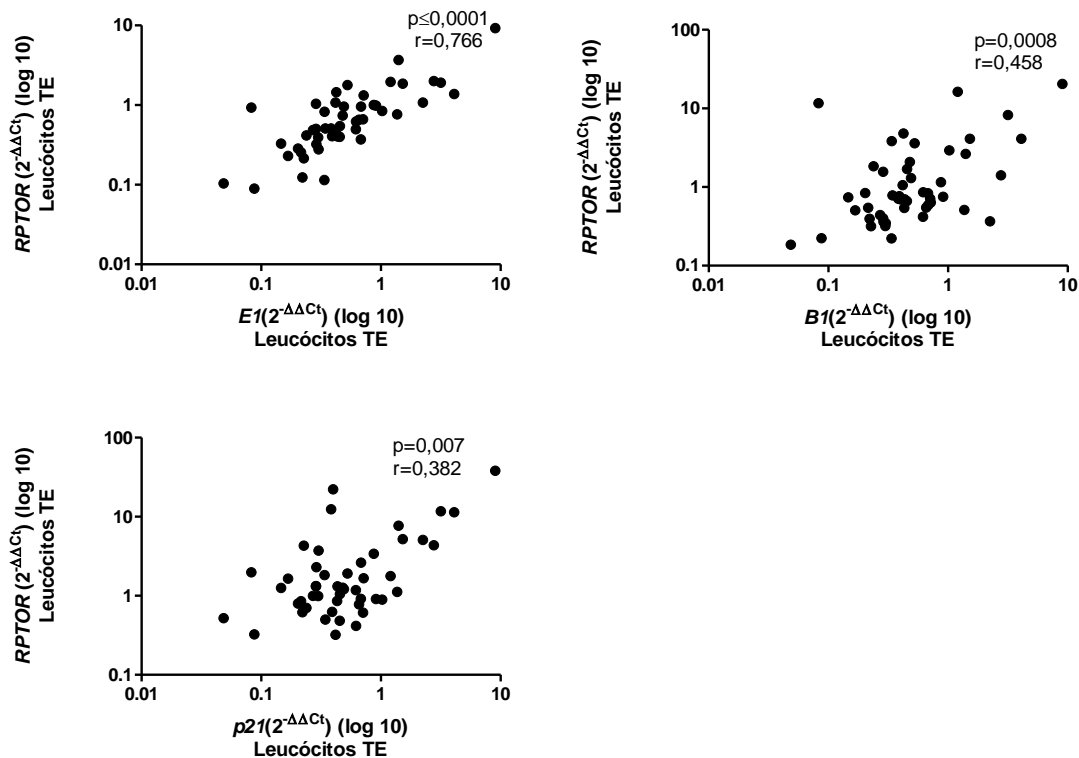
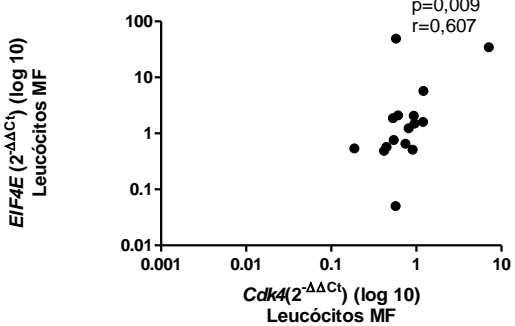
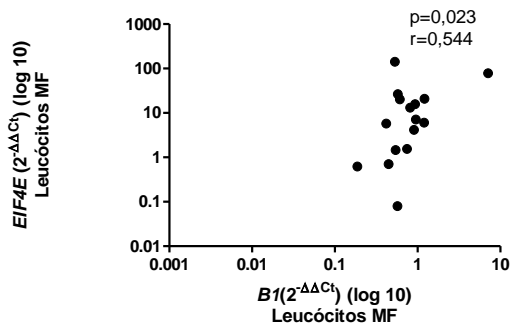
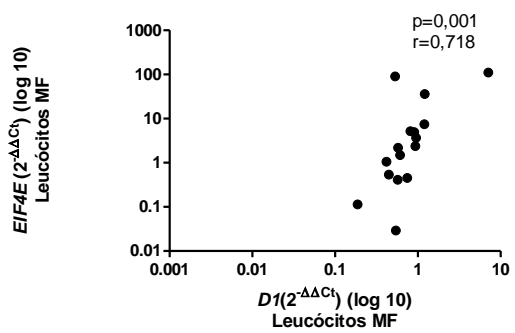
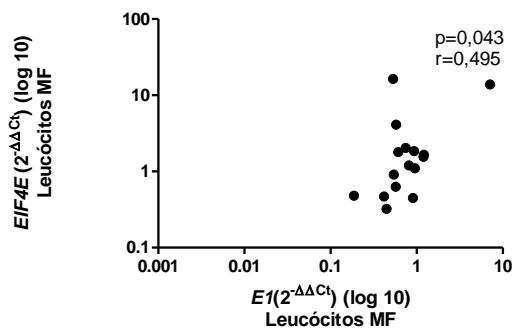
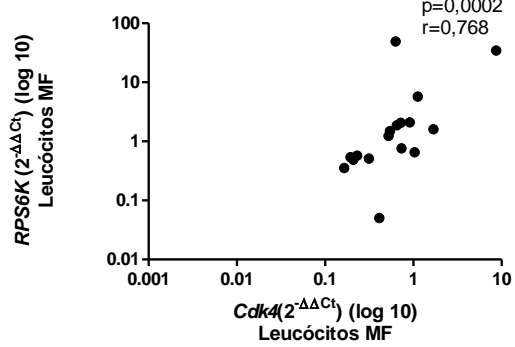
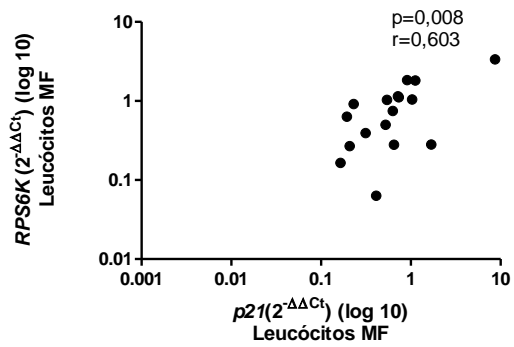
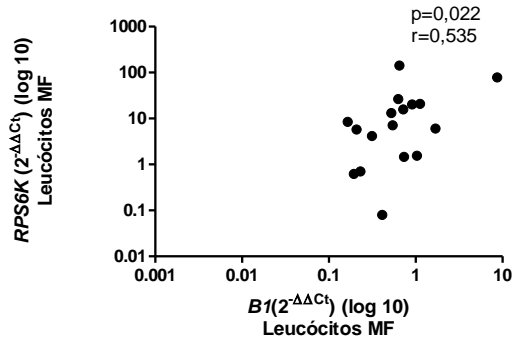
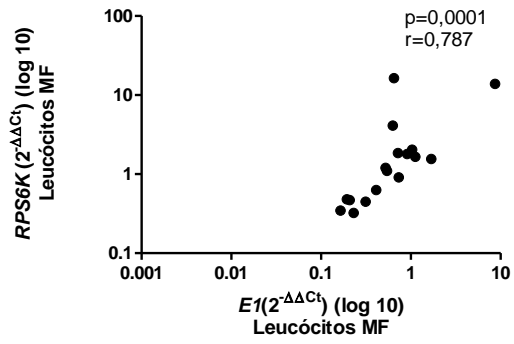


Fig.17: Correlação entre expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e a expressão dos genes associados ao ciclo celular em pacientes com TE. Correlação positiva para todos os genes *RPS6K* vs ciclinas *E1, D1 e B1*; *E1EIF4e* vs ciclina *E1, D1, B1 e p21*; *EIF4EBP* vs ciclinas *E1, D1, B1, p21, p27, Cdk2 e Cdk4*; *mTOR* vs ciclinas *E1, D1, B1, p21 e p27* e *RPTOR* VS ciclina *E1, B1 e p21*. Teste estatístico Spearman.

Nos pacientes com MF, foram observadas correlações positivas entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização mTORC1 e os níveis de expressão dos genes associados ao ciclo celular. Houve correlação entre os genes *RPS6K* vs *CICLINA E1, B1, P21 e CDK4* ($p = 0,0001; 0,022, 0,008$ e $0,0002$; respectivamente) e ($r = 0,787; 0,535; 0,0,603$ e $0,768$; respectivamente); *eIF4E* vs ciclinas *E1, D1, B1 e CDK4* ($p = 0,043; 0,001$ e $0,023; 0,009$, respectivamente) e ($r = 0,495; 0,718, 0,544$ e $0,607$, respectivamente). O gene *EIF4EBP* apresentou correlação apenas com *CDK4* ($p = 0,012; r = 0,593$) e *P21* ($p = 0,010; r = 0,602$). Para o gene *mTOR* foram observadas as correlações com os genes ciclina *E1* ($p = 0,006; r = 0,629$), *P21* ($p = 0,028; r = 0,529$) e *CDK4* ($p = 0,003; r = 0,674$). Não foram observadas correlações entre os níveis de expressão do gene *RPTOR* e os genes regulados do ciclo celular (Figura 18).



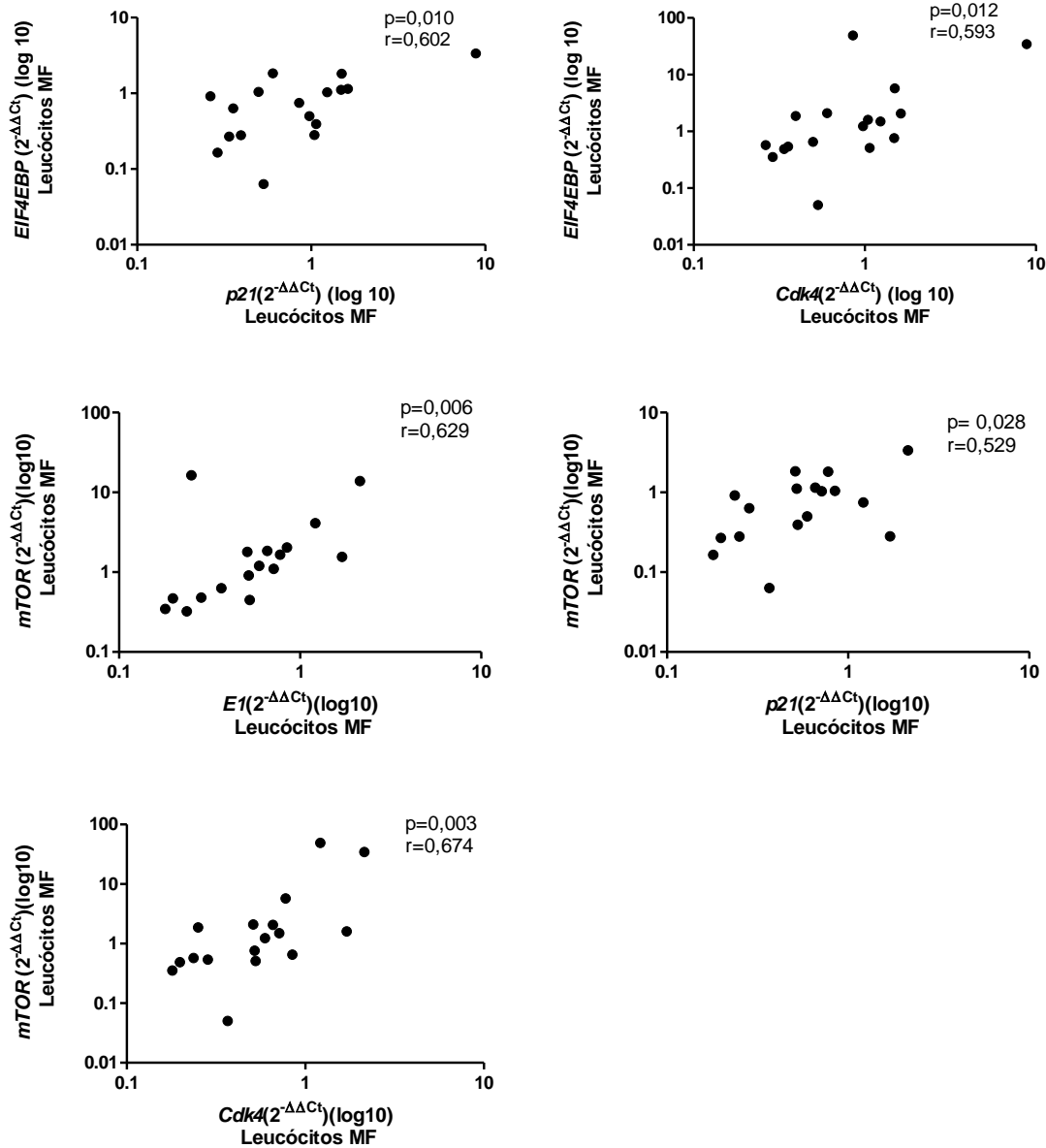


Fig.18: Correlação entre expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e a expressão dos genes associados ao ciclo celular em pacientes com TE. Correlação positiva para todos os genes *RPS6KVS* ciclinas *E1, B1, P21* e *CDK4*; *E1, EIF4e* vs ciclina *E1, D1, B1* e *CDK4*; *EIF4EBP* vs *P21* e *CDK4*; *m-TOR* vs ciclinas *E1, P21* e *CDK4*. O gene *RPTOR* não apresentou correlações significativas com os genes do ciclo celular. Teste estatístico Spearman.

Foi observada nos pacientes com PV a correlação negativa entre os níveis de expressão dos genes *RPS6K* vs *CICLINAB1* ($p=0,012$; $r=-0,484$), *EIF4EBP* e *CICLINA B1* ($p=0,044$; $r=-0,357$), *mTOR* e *CICLINA E1* ($p=0,032$; $r=-0,391$), *CDK2* ($p=0,016$; $r=-0,427$) e *CDK4* ($p=0,004$; $r=-0,500$) (Figura 19). Não foi detectada correção entre os níveis de expressão dos genes *EIF4E* e *RPTOR* nos pacientes com PV.

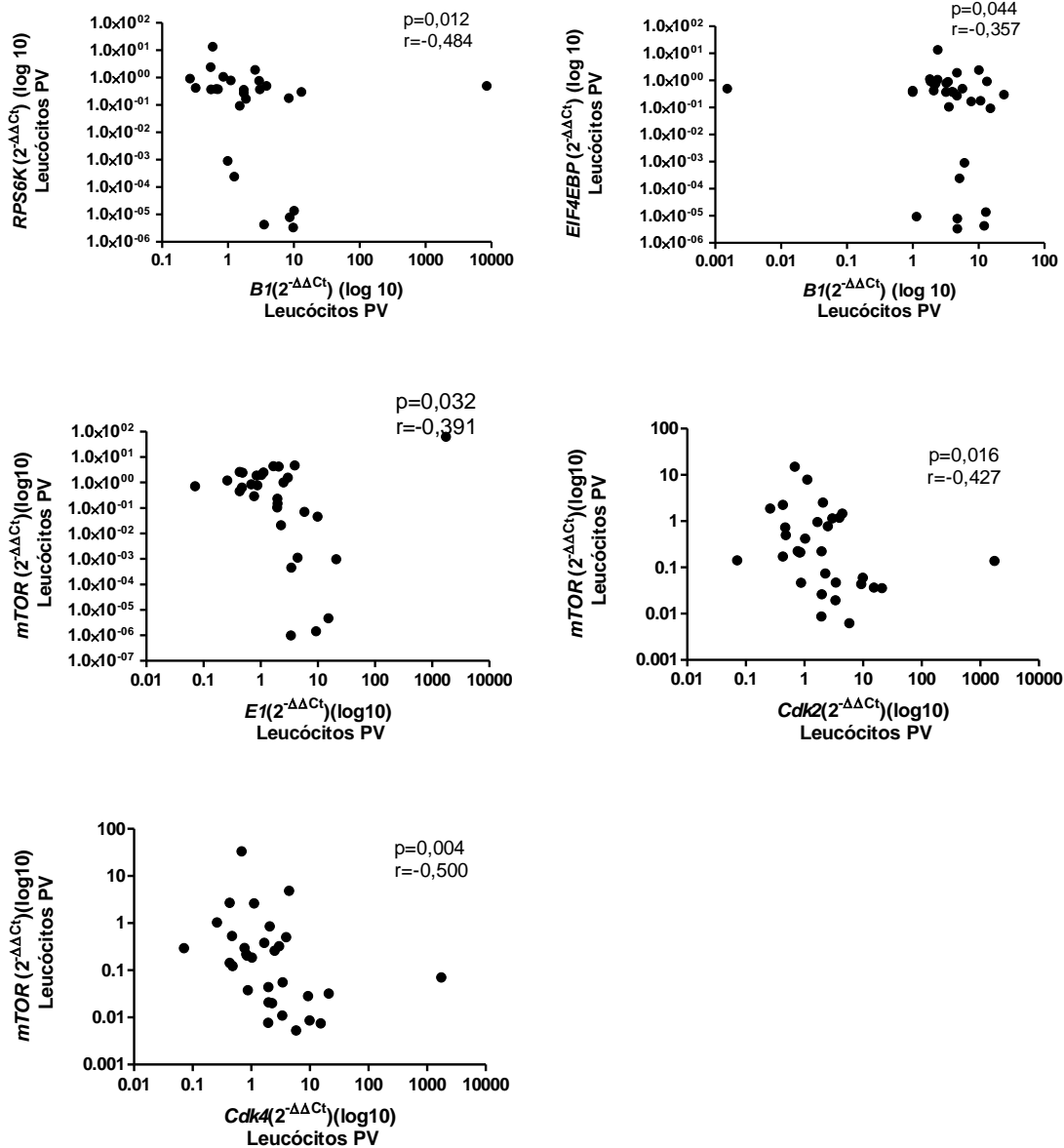


Fig.19: Correlação entre expressão dos genes envolvidos na via mTORC1 e a expressão dos genes associados ao ciclo celular em pacientes com TE. Correlação negativa para todos os genes *RPS6KVS* ciclinas *B1*; *EIF4EBP* vs ciclina *B1*; *mTOR* vs ciclinas *E1*, *Cdk2* e *Cdk4*. Os genes *EIF4e* e *rPTOR* não apresentaram correlações significativas com os genes do ciclo celular. Teste estatístico Spearman.

Tabela 15: Valores de (p) e (r) para correlações significativas entre os genes associados à via mTORC1 e os genes associados ao ciclo celular.

Correlação	<i>E1</i>	<i>D1</i>	<i>B1</i>	<i>P21</i>	<i>P27</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK4</i>
<i>RPS6K</i> TE	p=0,005 r=0,387	p=0,044 r=0,294	p=0,002 0,416	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
<i>EIF4e</i> TE	p=0,002 r=0,320	p≤0,0001 r=0,541	p=0,019 r=0,329	0,0002 r=0,501	----- -----	----- -----	----- -----
<i>EIF4EBP</i> TE	p≤0,0001 r=0,552	p≤0,0001 r=0,837	p=0,010 r=0,361	p=0,0006 r=0,479	p=0,037 r=0,343	p≤0,0001 r=0,545	p=0,040 r=0,296
<i>mTOR</i> TE	p≤0,0001 r=0,782	p=0,022 r=0,329	p≤0,0001 r=0,606	p=0,047 r=0,288	p=0,026 r=0,363	----- -----	----- -----
<i>RPTOR</i> TE	p≤0,0001 r=0,766	----- -----	p=0,0008 r=0,458	p=0,007 r=0,382	----- -----	----- -----	----- -----
<i>RPS6K</i> MF	p=0,0001 r=0,787	----- -----	p=0,022 r=0,535	p=0,008 r=0,603	----- -----	----- -----	p=0,002 r=0,768
<i>EIF4e</i> TE	p=0,043 r=0,495	p=0,001 r=0,718	p=0,023 r=0,544	----- -----	----- -----	----- -----	p=0,009 r=0,607
<i>EIF4EBP</i> MF	----- -----	----- -----	----- -----	p=0,010 r=0,602	----- -----	----- -----	p=0,012 r=0,593
<i>mTOR</i> MF	p=0,006 r=0,629	----- -----	----- -----	p=0,028 r=0,529	----- -----	----- -----	p=0,003 r=0,674
<i>RPTOR</i> MF	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
<i>RPS6K</i> PV	----- -----	----- -----	p=0,012 r=-0,484	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
<i>EIF4e</i> PV	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
<i>EIF4EBP</i> PV	----- -----	----- -----	p=0,044 r=-0,357	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
<i>mTOR</i> PV	p=0,032 r=-0,391	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	p=0,016 r=-0,427	p=0,004 r=-0,50
<i>RPTOR</i> PV	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----

4.2.12 Correlações não significativas entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização m-TOR, e os níveis de expressão dos genes associados ao ciclo celular nos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas

Os valores de ‘p’ para as análises sem que as correlações não foram significativas entre os genes da via mTORC1 e os genes associados ao ciclo celular analisados no RNA de leucócitos de sangue periférico dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (TE, MF e PV) são apresentados tabela 16.

Tabela 16: Valores de (p) para correlações não significativas entre os genes associados à via mTORC1 e os genes associados ao ciclo celular.

Correlação	<i>E1</i>	<i>D1</i>	<i>B1</i>	<i>P21</i>	<i>P27</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK4</i>
<i>RPS6K</i> TE	-----	-----	-----	p=0,566	p=0,756	p=0,093	p=0,624
<i>EIF4e</i> TE	-----	-----	-----	-----	p=0,327	p=0,201	p=0,821
<i>EIF4EBP</i> TE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>mTOR</i> TE	-----	-----	-----	-----	-----	p=0,625	p=0,180
<i>RPTOR</i> TE	-----	p=0,074	-----	-----	p=0,167	p=0,725	p=0,338
<i>RPS6K</i> MF	-----	p=0,064	-----	-----	p=0,089	p=0,144	-----
<i>EIF4e</i> TE	-----	-----	-----	p=0,078	p=0,701	p=0,268	-----
<i>EIF4EBP</i> MF	p=0,067	p=0,122	p=0,138	-----	p=0,903	p=0,680	-----
<i>mTOR</i> MF	-----	p=0,143	p=0,164	-----	p=0,135	p=0,422	-----
<i>RPTOR</i> MF	p=0,400	p=0,251	p=0,786	p=0,708	p=0,779	p=0,394	p=0,450
<i>RPS6K</i> PV	p=0,277	p=0,856	-----	p=0,908	p=0,924	p=0,487	p=0,476
<i>EIF4e</i> PV	p=0,493	p=0,421	p=0,375	p=0,888	p=0,037	p=0,529	p=0,776
<i>EIF4EBP</i> PV	p=0,075	p=0,639	-----	p=0,375	p=0,273	p=0,387	p=0,349
<i>mTOR</i> PV	-----	p=0,702	p=0,127	p=0,115	p=0,316	-----	-----
<i>RPTOR</i> PV	p=0,398	p=0,905	p=0,162	p=0,671	p=0,501	p=0,326	p=0,110

5. DISCUSSÃO

As Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs) cromossomo *Philadelphia* negativas (Ph -), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (PMF) são desordens clonais, relacionadas às células progenitoras hematopoéticas, caracterizadas pelo acúmulo de células maduras de uma ou mais linhagens sanguíneas (SAEIDI, 2015).

Na última década foram descritas várias mutações associadas às NMPs. A mutação no exon 14 do gene da JAK2 (JAK2V617F), a mais relevante delas, constitui importante marcador de diagnóstico para essas doenças. Posteriormente, a descrição da mutação na calreticulina (CALR) aperfeiçoou o diagnóstico molecular para pacientes com TE e PMF, mostrando que a mutação no gene JAK2 é importante, porém não a única envolvida na patogênese dessas doenças. Outras mutações como as descritas nos genes *TET2* (*oncogene family member 2*), *ASXL1* (*additional sex combs-like 1*), *CBL* (casitas *B-lineage lymphoma* proto-oncogene), *TP53* (tumor protein p53), dentre outras, parecem estar associadas ao fenótipo das NMP (SAEIDI, 2015).

Seguindo a premissa de que a mutação JAK2V617F é importante, porém não o único e nem o primeiro fator no desencadeamento das Neoplasias Mieloproliferativas, nosso grupo de pesquisa investiga as alterações dos genes e moléculas associadas à desregulação do processo apoptose e ciclo celular nestes pacientes. O presente trabalho dedicou-se aos estudos sobre a via m-TOR *per se* e em associação ao ciclo celular, com intuito de expandir os conhecimentos acerca da fisiopatologia das NMP e contribuir com a busca de novos mecanismos para controle das alterações que as caracterizam.

mTOR é uma serina/treonina quinase envolvida na regulação do crescimento celular, sobrevivência e metabolismo por meio da biogênese ribossomal, tradução de proteínas, expressão de genes relacionados ao metabolismo, captação de aminoácidos, inibição da apoptose, autofagia e regulação do ciclo celular. A via mTORC1 pode ser ativada por meio

do estímulo das vias de sinalização PI3K/AKT, RAS e oncogene Bcr-Abl (BARRETT, 2012).

Os principais alvos do complexo mTORC1 parecem ser as moléculas RPS6K1 e 4EBP1. A ativação de RPS6K1 induz a tradução da oligopirimidina 5' terminal, a síntese ribossomal, o bloqueio da apoptose e ainda regula negativamente IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) resultando no controle negativo da via de sinalização mTOR. Enquanto a fosforilação do componente 4EBP-1 regula a tradução de proteínas CAP dependente como c-Myc e ciclina D1, mediante sua liberação do fator eIF4E, que pode então se associar a eIF4G, formando o complexo iniciador de tradução eIF4F. Devido sua capacidade de realizar numerosas interações mTORC1, o eIF4F pode induzir a progressão do ciclo celular pela regulação de ciclinas quinase dependentes e promover a divisão e proliferação celular (BARRETT, 2012).

A literatura descreve que o efeito da desregulação da via de sinalização mTOR está associado ao aparecimento de distúrbios na proliferação, aumento da sobrevivência celular e ao desenvolvimento do câncer de mama, de ovário, de fígado, de leucemias, linfomas, dentre outras neoplasias (BARRETT, 2012).

As anormalidades observadas na via m-TOR podem ser de origem intrínseca ou em consequência da presença de mutações em outros componentes celulares capazes promover sua ativação (BARRETT, 2012).

Em estudo recente, CHENG e colaboradores (2015) relataram a maior expressão da proteína mTOR em câncer de mama, demonstrando seu papel chave no desenvolvimento deste tipo de câncer. O mesmo estudo aponta ainda que o inibidor de mTOR, o CCI-779, é efetivo na inibição da proliferação da linhagem MDA-MB-231, células de adenocarcinomas mamário, de maneira dose e tempo dependente.

Nosso estudo descreveu a alteração da expressão de genes associados à via mTORC1 em leucócitos de pacientes com PV, TE, MF e em linhagens SET-2 e HEL.92.1.7.

Em nosso estudo observamos o aumento dos níveis de expressão do gene *RPS6K* em pacientes com PV e TE, o que corrobora com os achados descritos por BARRETT, 2012 que descrevem a modulação exercida por *RPS6K* nos níveis de expressão de BAD. A análise deste resultado em conjunto com a diminuição da expressão do gene pro-apoptótico *Bad* em pacientes com PV verificada por nosso grupo e descrito em Gasparotto e colaboradores, 2011, reafirma a possível associação do bloqueio da apoptose promovido por mTORC1.

A diminuição nos níveis de expressão de *RPS6K* nas linhagens SET-2 e HEL.92.1.7 tratadas com o inibidor de JAK2 sugere que a expressão desse gene é dependente da atividade quinase constitutiva promovida pela mutação JAK2V617F. Esse dado apesar de não termos observado diferença de expressão associado ao *status* da mutação JAK2V617F nos pacientes com NMP analisados.

Outro dado importante observado em nosso estudo diz respeito à menor expressão do gene *EIF4E* em pacientes com PV e na linhagem HEL.92.1.7 após inibição da via JAK/STAT na linhagem o que sugere a relação da via m-TOR com a regulação do ciclo celular em NMP.

A escolha da molécula eIF4E para avaliação do envolvimento da via mTORC1 na fisiopatologia das NMPs deve-se ao fato desta a molécula ser relevante na cascata de ativação desta via. eIF4E é um componente limitante no desencadeamento da tradução do RNAm e seu aumento de expressão contribui para o estabelecimento de cânceres, desencadeando o crescimento neoplásico por meio da tradução de proteínas com potencial oncogênico, tais como c-FLIP, Ciclina D, c-Myc, dentre outras. eIF4E pode ser considerado como um dos oncogenes pivô da carcinogênese induzindo nas células resistência à apoptose e intensificando a capacidade proliferativa metastásica (UR RASOOL *et al.*, 2016).

Trabalhos da literatura reforçam a nossa hipótese de que a alteração na expressão dos genes da via m-Tor, detectadas em nosso estudo, está associada a mieloproliferação e o mieloacúmulo, como a descrição da redução da proliferação de clones mutados na presença de inibidores de m-TOR e JAK 2 nas linhagens Ba/F3-EPOR, SET-2 e HEL.92.1.7 portadoras da mutação JAK2V617F apontada por BOGANI e colaboradores (2013). Neste estudo foi observada interrupção da transição G0/G1 e subsequente redução da fase S e consequente proliferação.

Nas figuras 20 A e B estão compilados os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho. Levando-se em consideração nossos achados a nossa teoria é de que os membros da via m-TOR encontram-se desregulados nas linhagens JAK2V617F positivas.

As amostras de pacientes analisadas não apresentaram perfil de expressão gênica diferenciado entre pacientes portadores ou não da mutação JAK2V617F, nem associação com a carga alélica dos pacientes. Este dado apesar de diferente ao verificado nas linhagens, pode estar associado ao tamanho das amostras ou ao fato dos experimentos terem sido realizados no pool de leucócitos totais e em pacientes com diferentes cargas alélicas.

Nas células de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas ficou demonstrado o aumento da expressão dos genes, o que em tese favorece a tradução de proteínas CAP dependentes associadas ao mieloacúmulo e mieloproliferação celular, como demonstrado na figura 20A.

Hipótese que pode ser confirmada a partir dos resultados observados na figura 20 B, nas linhagens tratadas com inibidores de JAK2 e AKT. A escolha da inibição dessas duas vias foi realizada com o objetivo de verificar se há vínculo entre a ativação constitutiva da via JAK/STAT e o perfil dos genes da via de sinalização mTORC1 em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.

A inibição da via AKT, foi realizada com o intuito de observar sua potencial capacidade em modular a expressão dos genes da via mTORC1 em linhagens JAK2V617F positivas. Isto pelo fato de que a via m-Tor pode ser ativada de modo dependente ou independente de AKT. Os dados obtidos indicaram que a inibição da via AKT modula negativamente a expressão dos genes *RPS6K*, *EIF4EBP1* e *eIF4E*, o que bloqueia a proliferação celular e sensibiliza a célula neoplásica à apoptose. Isto porque estes genes em situação fisiológica estão diretamente relacionados a tradução de proteínas relacionadas a progressão do ciclo celular e a apoptose

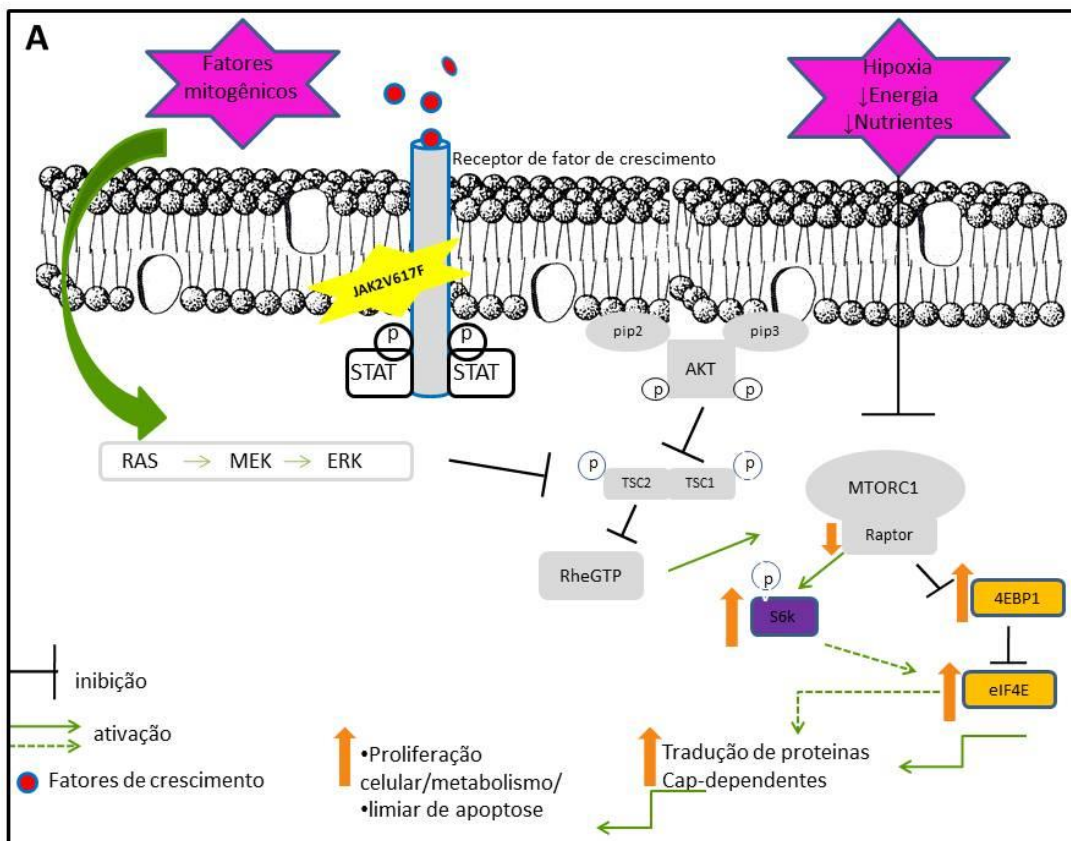


Figura 20 A: Compilação dos resultados da expressão dos genes da via m-TOR em leucócitos dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.

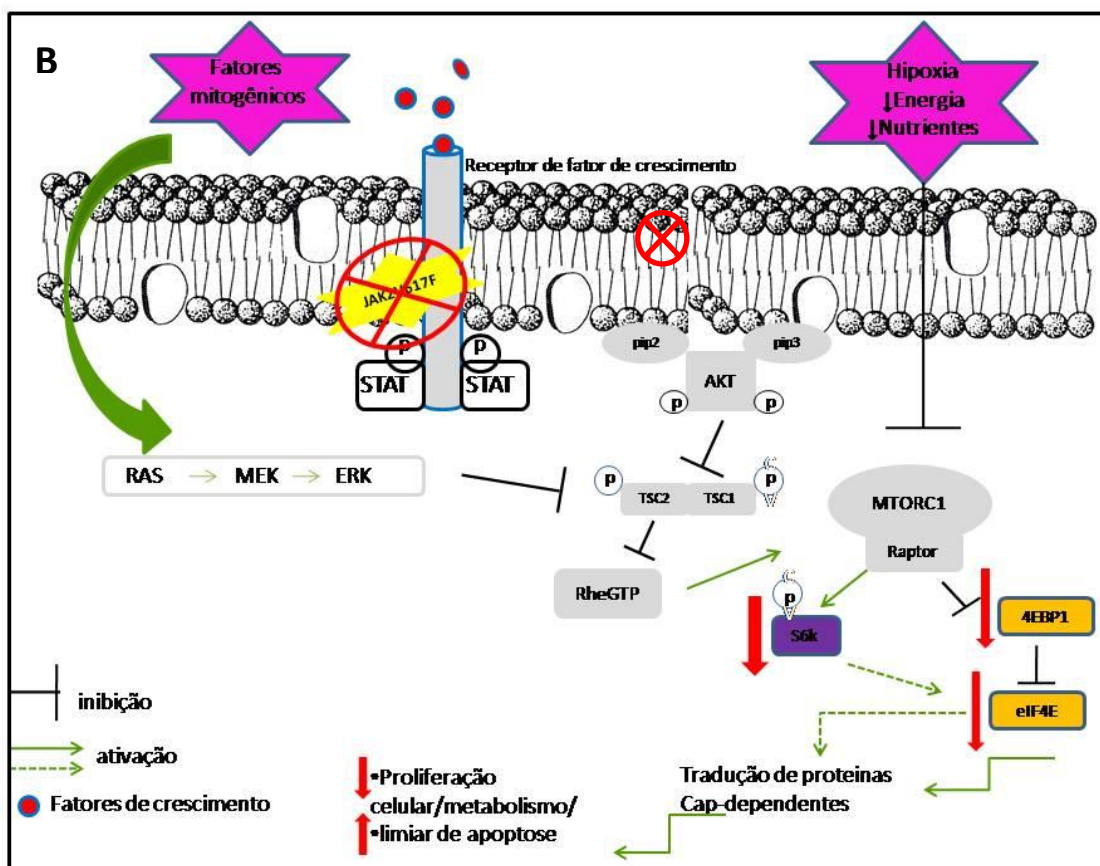


Figura 20 B: Compilação dos resultados observados nas linhagens celulares SET-2 e HEL.92.1.7 após tratamento de inibição das vias JAK2 e AKT.

A regulação do processo do ciclo celular em NMP foi também foco do presente estudo, dada sua relação com a via m-TOR e fisiopatologia das NMP.

Alterações na regulação da progressão do ciclo podem estar diretamente associadas a mieloproliferação e mieloacúmulo. Foram observadas anomalias de expressão de moléculas que controlam positivamente a progressão do ciclo celular, ciclinas e CDKs, como a diminuição da expressão de *ciclina D1* e *CDK2* em pacientes com TE e diminuição da expressão de *ciclinas E1, B1* e *CDK4* em pacientes com PV. Foram verificadas diferenças nas linhagens celulares SET-2 e HEL.92.1.7 não tratadas e tratadas com inibidores de JAK2 e AKT (Tabelas 8 e 9), sugerindo possível modulação do ciclo celular, uma vez que a formação do complexo CDK-ciclina está diretamente associada à progressão do ciclo, como

a formação do complexo ciclina E-CDK2 que promove a entrada na fase S do ciclo celular. (LIM S;KALDIS P, 2013).

Foram observadas alterações na expressão de reguladores negativos do ciclo celular, os CKIs (inibidores de ciclinas), como a diminuição da expressão dos genes *P21* e *P27* em leucócitos de pacientes com Trombocitemia Essencial (Figura 5) e em alguns tempos nas linhagens tratadas com inibidores (Tabelas 8 e 9), corroborando com achados observados por TOGNON e co-autores (2015) que demonstraram hipermetilação de *ciclina E1* e *P21* na linhagem celular HEL.92.1.7 tratada com JII (JAK inibitor I).

TOGNON e co-autores (2015) descreveram a similaridade do perfil de metilação entre os pacientes com Policitemia Vera e Mielofibrose Primária e, nosso estudo, aponta para a mesma similaridade entre PV e MF em relação ao perfil de expressão dos genes associados ao ciclo celular, uma vez que não observamos diferenças significativas na comparação entre os níveis de expressão de tais genes nessas doenças. E entre PV, MF e TE

Os dados de correlação obtidos da análise entre os níveis de expressão dos genes associados à via de sinalização mTORC1 e genes associados ao ciclo celular indicaram a correlação positiva nos pacientes com TE e MF (Figuras 17 e 18). Contrariamente, os pacientes de PV apresentam correlação negativa entre os dados analisados, sugerindo assim perfis diferenciais de expressão dos genes do ciclo celular entre as doenças do que diz respeito a relação estabelecida entre a via de sinalização mTORC1 e o ciclo celular, o que nos permite levantar hipóteses em torno desta distinção. Estaria a via mTORC1 modificando a progressão do ciclo celular em pacientes com TE e MF e contribuindo, para o estabelecimento de sintomas mais observados nesses pacientes?

Os resultados encontrados em nosso estudo apontam para a alteração na regulação da via mTORC1 e do ciclo celular em pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas. em

especial os portadores da mutação JAK2V617F, bem como a atuação concomitante destes múltiplos fatores no desenvolvimento e manutenção das NMP.

Os dados obtidos e analisados sugerem novas abordagens para o entendimento e interpretação da fisiopatologia das NMP, assim como para uma melhor caracterização do perfil de cada NMP. Apesar de apresentarem similaridades, o desenvolvimento da PV, TE e MF ocorre de maneira distinta na maioria dos pacientes e os resultados aqui apresentados indicam que os componentes da via m-TOR e os do ciclo celular contribuem para essa diferença de fenótipo das NMP.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas, PV, TE e MF apresentam alteração nos níveis de expressão de genes associados a via mTORC1 e ciclo celular em leucócitos de sangue periférico;
- ✓ A inibição farmacológica das vias JAK/STAT e AKT promove alteração na expressão dos genes associados à via mTORC1 e ciclo celular nas linhagens celulares JAK2V617F positivas;
- ✓ Diminuição da expressão do gene *EIF4E* pós inibição da via JAK/STAT e AKT, nas linhagens SET-2 e HEL 92.1.7 nos tempos de 4h, 8h e 24h.
- ✓ Correlação entre os níveis de expressão gênica obtidos e o status da mutação JAK2, observada apenas para os genes *mTOR* e *RPTOR* em pacientes com TE;
- ✓ Correlação entre os níveis de expressão dos genes *mTOR*, *RPTOR* e *EIF4EBP* e os parâmetros clínico laboratoriais (plaquetas, hematócrito e leucócitos) de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas.

7. Referências bibliográficas

BARTALUCCI, N; TOZZI, L.; BOGANI, C.; MARTINELLI, S.; ROTUNNO, G.; VILLEVAL, JL.; VANNUCCHI, AM. Co-targeting the PI3K/mTOR and JAK2 signalling pathways produces synergistic activity against myeloproliferative neoplasms. **J Cell Mol Med.** v;17, p.1385-96, 2013.

BAXTER, E.J.; SCOTT, L.M.; CAMPBELL, P.J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK 2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, p. 1054-1061, 2005.

BARRETT, D; BROWN, V.I; GRUPP, S.A AND TEACHEY, D.T. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Axis in Children with Hematologic Malignancies. **Paediatr Drugs**, v.14, p. 299-316, 2012.

BOGANI, C.; BARTALUCCI, N.; MARTINELLI, S.; *et al.* Mtor inhibitors alone and in combination with jak2 inhibitors effectively inhibit cells of myeloproliferative neoplasms. **Plos One**, v.8, Issue 1, 2013.

BOGANI, C.; GUGLIELMELLI, P.; ANTONIOLI, E. ; *et al.* B-, T-, and NK-cell lineage involvement in JAK2V617F-positive patients with idiopathic myelofibrosis. **Haematologica**, v. 92, p. 258-259, 2007.

CAMPO,E; SWERDLOW, SH; HARRIS, NL *et al.* The 2008 WHO Classification of Lymphoid Neoplasms and beyond evolving concepts and practical applications. **Blood.** v. 117, n. 19, p. 5019–5032, 2011.

CHENG, X.F; LIU, Q; ZHANG, X.F *et al.* Expression of mTOR and its inhibitory effect on cell proliferation and apoptosis of breast cancer cells. **J Biol Regul Homeost Agents.**, v. 29, p. 869-73, 2015.

CHOI CW, BANG SM, JANG S, JUNG CW, KIM HJ, KIM HY.; *et al.* Guidelines for the management of myeloproliferative neoplasms. **Korean J. Intern Med**, v. 30, n.6, p.771-88, 2015.

DAI, C.; CHUNG, I.J.; KRATZ, S.B. Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt/PKB. **Exp. Hematol.**, v. 33, p. 152-158, 2005.

DAZERT, E.; HALL, M.N. m-TOR signaling in disease. **Cell Biology**, v.23, p.744-755, 2011.

DOBASHI, Y.; WATANABE, Y.; *et al.* Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. **Int J ExpPathol**, v. 4, p. 476-495, 2011.

EL-HABR, EA; LEVIDOU, G.; TRIGKA, EA.; SAKALIDOU, J.; PIPERI, C.; CHATZIANDREOU, I. Complex interactions between the components of the PI3K/AKT/mTOR pathway, and with components of MAPK, JAK/STAT and Notch-1 pathways, indicate their involvement in meningioma development.. **Virchows Arch**. V, 465, p. 473-85, 2014.

FURUHATA, A. *et al.* p27 deregulation by Skp2 overexpression induced by the JAK2V617 mutation. **BiochemBiophys Res Commun**,v. 383, n. 4, p. 411-416, 2009.

GASPAROTTO, E. P.L; TOGNON R; FERREIRA A.L; OLIVEIRA, G.L.V; PALMA, P.V.B; ZANICHELLI, M.A. *et al.* Deregulated expression of *A1*, *Bcl-2*, *Bcl-x_L*, and *Mcl-1* antiapoptotic proteins and *Bid*, *Bad*, and *Bax* proapoptotic genes in polycythemia vera patients. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, p.873-86, 2011.

GREEN, A.R.; VASSILIOU G.S.; CURTIN, N.; *et al.* Management of the myeloproliferative disorders: distinguishing data from dogma. **Hemat. J.**, v. 5, p. S126-S132, 2004.

HARRISSON, C.N.; GREEN, A.R. Essential thrombocythemia. **Hematol. Oncol. Clin.N. Am.**, v. 17, p. 1175-1190, 2003.

KAUSHANSKY, K. The chronic myeloproliferative disorders and mutation of JAK2: Dameshek's54 year old speculation comes of age. **Best Pract. Clin Haematol.** v. 20, p. 5-12, 2007.

KELLY, K.R.; ROWE, J.H. Mammalian target of rapamycin as a target in hematological malignancies. **Target Oncol.**, v. 6, p. 53-61, 2011.

KHWAJA, A. The role of Janus Kinase in haemopoiesis and haematological malignancy. **Br.J.Haematol.**,v. 134, p. 366-84, 2006.

KISSELEVA, T.; BHATTACHARYA, S.; BRAUNSTEIN, J.; SCHINDLER, C.W. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene**, v. 285, p. 1-24, 2002.

LIM, S AND KALDIS, P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**. v.140, p.3079-93, 2013.

PAPAYANNOPOULOU, M.P. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. **Science**, v 216, p. 1233-5, 1982.

MCLORNAN, D; HARRISON, C. Combination therapies in Myeloproliferative Neoplasms: why do we need them and how to identify potential winners? *J Cell. Mol. Med*, v.17, p 1410-4, 2013.

MCMULLIN M. F.; WILKINS B. S.; HARRISON C. N. Management of polycythaemia vera: a critical review of current data. **Br J. Hematol.**, 2015 [epub ahead of print].

Memmott, RM, Dennis, PA. Akt-dependent and independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. **Cell Signal**. v, 5, p. 656-64, 2009.

NAKATAKE, M. *et al.* JAK2 (V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. **Oncogene**, v. 31, p. 1323-1333, 2011.

REILLY, J.T. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis to treatment. **Hematol Oncol**, v. 24, p. 56-63, 2006.

SAEIDI, K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics, **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, ahead of print, 2015.

SPELETAS, M.; KATODRITOU, E.; DAIYOU, C.; *et al.* Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. **Leuk Res.**, v. 31, p. 1053-1062, 2007.

SPIVAK, J.L. Polycythemia vera: myths, mechanisms and management. **Blood**, v. 100, p. 4272–4290, 2002.

SPIVAK, J.L. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. **Seminar. Hematol.**, v. 41, p. 1–5, 2004.

TEFFERI, A. CME Information: Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 90, 2015.

TEFFERI, A.; ELLIOT, M.A.; YOON, S.Y *et al.* Clinical and bone marrow effects of interferon alfa therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Blood**, v. 97, p. 1896, 2001.

TEFFERI, A; PARDANAMI, A. Myeloproliferative Neoplasms A Contemporary Review. **JAMA Oncology**, v.1, P. 97- 105, 2015.

TEFFERI, A.;THIELE, J.;VARDIMAN, J.W. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos.**Cancer**,v. 115, p. 3842-7, 2009.

TOGNON, R.; GASPAROTTO, E.P.; LEROY, J.M.G; *et al.* Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in chronic myeloproliferative diseases. **J. Clin Pathol**, v.64, p. 75-82, 2011.

TOGNON, R.; GASPAROTTO, E.P.; NEVES, R.P *et al.* Deregulation of apoptosis-related genes is associated with PRV1 overexpression and JAK2 V617F allele burden in Essential Thrombocythemia and Myelofibrosis. **J. Hematol. Oncol**,v.5, n. 2, p. ...,2012.

TOGNON, R; NUNES, N.S; AMBROSIO, L *et al.* Apoptosis- and cell cycle-related genes methylation profile in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia and Lymphoma**, Early online 1-4.

UOZUMI, K.; OTSUKA, M.; OHNO, N. Establishment and characterization of a new human megakaryoblastic cell line (SET-2) that spontaneously matures to megakaryocytes and produces platelet-like particles. **Leukemia**. v, 14, p. 142-152, 2000.

UR RASOOL, R; RAH, B; AMIN, H; NAYAK, D; CHAKRABORTY, S; RAWOOF, A; *et al.* Dual modulation of Ras-Mnk and PI3K-AKT-mTOR pathways: A Novel c-FLIP inhibitory mechanism of 3-AWA mediated translational attenuation through dephosphorylation of eIF4E. **Scientific Reports**. v. 6, art. n° 18800, 2016.

VAINCHENKER, W.; DELHOMMEAU, F.; VILLEVAL, J. L. Molecular pathogenesis of myeloproliferative diseases. **Hematological Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association**: v.1, p. 239 – 246, 2007.

VARDIMAN, J.W.; THIELE, J.; ARBER, D.A. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, p. 937 –951, 2009.

8. ANEXOS

Anexo 1- Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-RP



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO - FCFRP/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação das Vias Hedgehog e M-Tor com a Resistência à Apoptose e Alteração do Ciclo Celular em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas

Pesquisador: Natalia de Souza Nunes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 11999913.4.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 346.940

Data da Relatoria: 06/06/2013

Apresentação do Projeto:

Não há muitas informações na literatura sobre a fisiopatologia e evolução das Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas, o que impede o desenvolvimento de fármacos eficientes para terapia e o estadiamento. A mutação pontual do gene que codifica a Janus Kinase 2 (JAK2V617F), presente em aproximadamente 90% dos pacientes foi a única alteração genética associada ao pior prognóstico dos pacientes. Essa mutação resulta na ativação constitutiva da enzima JAK2 e conseqüentemente das vias de sinalização associadas à proliferação e a apoptose celular. A hipótese do projeto de pesquisa é de que a via de sinalização Hedgehog e m-TOR participam como vias de conexão das alterações dos processos de apoptose, ciclo celular e via JAK/STAT nas NMPC. Esse trabalho contribuirá para a descrição de novos alvos terapêuticos dependentes e independentes da ativação da JAK2 e para o melhor conhecimento da interação das vias de sinalização que contribuem para o estabelecimento das NMPC.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a potencial interação de moléculas da via Hedgehog e da via m-TOR com a maquinaria apoptótica e ciclo celular em células positivas para a mutação JAK2V617F e pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas (NMPC). Mais especificamente, serão analisadas a expressão de genes que codificam moléculas associadas à regulação do ciclo celular.

Endereço: Avenida do café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-4213

Fax: (16)3602-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

Página 01 de 1



Continuação do Parecer: 346.940

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos, referentes à punção venosa, e os benefícios do estudo foram descritos no projeto de pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Descritos acima.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, um para os voluntários saudáveis e outro para o grupo de pacientes. O TCLE apresentado está em linguagem acessível e apresenta todas as informações necessárias para o sujeito da pesquisa.

Recomendações:

O protocolo ficou pendente para esclarecimento sobre o número de amostras de cada grupo de indivíduos (pacientes, voluntários saudáveis e biorrepositório). A pesquisadora anexou uma carta na Plataforma Brasil, esclarecendo estes números (casuística). Entretanto, a carta da pesquisadora não está assinada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada consta.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado pelo CEP/FCFRP em sua 116ª reunião extraordinária. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/13, item IV.5, letra d, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Sugerimos que o TCLE seja apresentado ao sujeito da pesquisa em documento impresso frente e verso.

Endereço: Avenida do café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-4213 **Fax:** (16)3602-4892 **E-mail:** cep@fcrp.usp.br

Página 02 de 02

Anexo 2- Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação das Vias Hedgehog e M-Tor com a Resistência à Apoptose e Alteração do Ciclo Celular em Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas

Pesquisador: Natalia de Souza Nunes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 11999913.4.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 364.325

Data da Relatoria: 01/08/2013

Apresentação do Projeto:

de acordo com o parecer da instituição proponente.

Objetivo da Pesquisa:

de acordo com o parecer da instituição proponente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

de acordo com o parecer da instituição proponente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

de acordo com o parecer da instituição proponente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

de acordo com o parecer da instituição proponente.

Recomendações:

não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

de acordo com o parecer da instituição proponente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

