UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em linhagens celulares tratadas com inibidor comercial da via JAK-STAT

Guilherme Wataru Gomes

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em linhagens celulares tratadas com inibidor comercial da via JAK-STAT

Guilherme Wataru Gomes

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gomes, Guilherme Wataru
G633e Expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em linhagens celulares tratadas com inibidor comercial da via JAK-STAT / Guilherme Wataru Gomes. -- São Paulo, 2015.
86p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria

1. Hematologia 2. Expressão gênica 3. Farmacogenética I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.15 CDD

Guilherme Wataru Gomes

Expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em linhagens celulares tratadas com inibidor comercial da via JAK-STAT

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Orientadora/Presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

À Deus, por iluminar o meu caminho

A meus pais, Carlos e Yurico, e ao
meu irmão, Victor, pelo amor e apoio
incondicional para que eu chegasse
até essa etapa de minha vida

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em nome de sua diretora, Profa. Dra. Terezinha De Jesus Andreoli Pinto, por ter sido fundamental em minha formação profissional.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, em nome de sua chefe, Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, em nome de sua coordenadora, Profa. Dra. Irene da Silva Soares, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

À querida Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, pela oportunidade, confiança e orientação na realização deste trabalho. Obrigado por sempre acreditar em meu potencial. Serei sempre grato pelo apoio e pela amizade.

À Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela colaboração nas diversas etapas do presente trabalho, e por todos os ensinamentos nas técnicas de cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Rui Curi, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, por disponibilizar gentilmente a área experimental de seu laboratório para a realização dos experimentos do cultivo celular, e por ceder as células HepG2 e Caco-2 para os experimentos do presente estudo.

À Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, pela colaboração e por ceder as células *JAK2*^{V617F} positivas para a realização dos experimentos; e à Profa. Dra. Raquel Tognon Ribeiro, pelo auxílio com a realização dos experimentos e com as técnicas de cultivo das células *JAK2*^{V617F} positivas.

Às queridas amigas Luciene Terezina de Lima e Daniela Prudente Teixeira Nunes, por estarem sempre ao meu lado nas etapas deste trabalho, e por seus ensinamentos, conselhos e amizade constante, serei sempre grato.

À farmacêutica Renata Chaves Albuquerque, por todo o auxílio com as técnicas e análises dos experimentos de citometria de fluxo.

À Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata e ao Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, pela disponibilização dos equipamentos de seu laboratório para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, Profa. Dra. Maria de Lourdes Chauffaille e Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, pelas valiosas considerações feitas durante meu Exame de Qualificação.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia Clínica, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Daniela Nunes, Luciene Lima, Juliano Bertinato, Clóvis Paniz, Maylla Lucena, Patricia Amorim, Cecilia Palchetti, Marcela Prieto, Bruna Cipriano, Brisa Saraiva e Paloma Nascimento. Muito obrigado por todo o aprendizado, pela convivência agradável e por terem feito a diferença em minha vida. Obrigado também aos que já fizeram parte desse grupo, e aos “agregados” (Alexandre Marchi, Aécio Braga e Maryana Branquinho), pelo companheirismo, amizade e por tornarem os dias da Pós-Graduação mais agradáveis.

Por fim, a todos que colaboraram diretamente ou indiretamente com este trabalho, meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento à pesquisa:

Financiamento:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo n° 2012/12957-5)

Bolsas:

- Iniciação Científica
  - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo n° 2012/01081-1)

- Mestrado
  - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
  - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (processo n° 132851/2014-8)

Desejo que você

Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.

Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.

Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.

Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.

Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.

Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,

Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.

Seja um debatedor de idéias. Lute pelo que você ama.

Augusto Cury

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios utilizados no diagnóstico da mielofibrose..... 26

Tabela 2. Categorias de risco segundo a DIPSS-*plus* para o prognóstico da mielofibrose, média de sobrevida e conduta empregada em cada caso..... 27

Tabela 3. Inibidores de JAK em desenvolvimento clínico para o tratamento de neoplasias mieloproliferativas..... 28

Tabela 4. Características dos ensaios *Taqman*® utilizados para avaliação da expressão dos genes candidatos pela técnica de PCR em tempo real..... 40

Tabela 5. Características dos ensaios *Taqman*® utilizados para avaliação da expressão dos genes em estudo pela técnica de PCR em tempo real..... 41

Tabela 6. Características dos anticorpos utilizados no ensaio de detecção dos transportadores de membrana por citometria de fluxo..... 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da JAK2..... 20

Figura 2. Via de sinalização JAK-STAT em uma célula hematopoética..... 21

Figura 3. Detecção de STAT5 fosforilada (P-STAT5) nas células HEL92.1.7 tratadas com 1,00 µM de *JAK Inhibitor I* por 24h (JII 1 µM 24h) e controles (DMSO)..... 38

Figura 4. Análise de viabilidade celular de HepG2 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*)..... 43

Figura 5. Efeito do inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*) sobre a viabilidade **(A)** e a fragmentação do DNA **(B)** das células HepG2..... 44

Figura 6. Efeito do inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*) sobre a viabilidade **(A)** e a fragmentação do DNA **(B)** das células Caco-2..... 45

Figura 7. Valores de estabilidade de expressão média (M) para os genes candidatos nos ensaios com células **(A)** HepG2 e **(B)** Caco-2..... 46

Figura 8. Expressão de RNAm dos transportadores **(A)** ABCB1, **(B)** ABCG2 e **(C)** SLC22A1, em células HepG2 tratadas com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*)..... 48

Figura 9. Expressão de RNAm dos transportadores **(A)** ABCB1, **(B)** ABCG2, **(C)** SLC22A1 e **(D)** SLCO1A2 em células Caco-2 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*)..... 49

Figura 10. Expressão de RNAm dos transportadores **(A)** ABCB1, **(B)** ABCG2 e **(C)** SLC22A1, em células HEL92.1.7 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*)..... 50

Figura 11. Expressão dos transportadores **(A)** ABCB1 e **(B)** ABCG2 em células HepG2 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*)..... 51

Figura 12. Expressão dos transportadores **(A)** ABCB1 e **(B)** ABCG2 em células Caco-2 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*)..... 51
Figura 13. Expressão dos transportadores **(A)** ABCB1 e **(B)** ABCG2 em células HEL92.1.7 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*)..... 52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores de risco para mielofibrose, segundo classificação DIPSS-*plus*..... 25

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Conjunto de ligação ao ATP
ACTB	Beta-actina
B2M	Beta-2-microglobulina
Bad	*Bcl2-associated agonist of cell death*
Bcl2	*B-cell lymphoma 2*
Bclx	*B-cell lymphoma extra large*
BCR-ABL1	*Breakpoint cluster region-ABL proto-oncogene 1*
BCRP	*Breast cancer resistance protein*
b-FGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
CALR	Calreticulina
CBL	*Casitas B-cell lymphoma*
C_T	*Cycle Threshold*
DIPSS	*Dynamic International Prognostic Scoring System*
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*
EMA	*European* Medicine Agency
EPO	Eritropoetina
FDA	*Food and Drug Administration*
FERM	*Four-one, ezrin, radixin and moesin*
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GM-CSF	Fator estimulante de colônia granulocítico-macrofágico
HMBS	Hidroximetilbilano sintase
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase
IL	Interleucina
IWG-MRT	*International Working Group for MPN Research and Treatment*
JAK	Janus quinase
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LNK	*Lymphocyte adaptor protein*

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDR1	*Multidrug resistance gene 1*
MF	Mielofibrose
MPL	Receptor de trombopoetina
NMP	Neoplasia mieloproliferativa
OATPs	Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos
OATs	Transportadores de ânions orgânicos
OCTs	Transportadores de cátions orgânicos
OMS	Organização mundial da saúde
pb	Pares de bases
PBS	*Phosphate buffered saline*
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
P-gp	Glicoproteína-P
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Fosfaditil inositol 3-quinase
PTP	Tirosino fosfatases
PV	Policitemia vera
SH2	*Src homology*
SLC	Carreadores de soluto
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SOCS	Proteínas supressoras da sinalização de citocinas
STAT	Proteína transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição
TE	Trombocitemia essencial
TPO	Trombopoetina
TYK2	Tirosinoquinase 2
UBC	Ubiquitina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

GOMES, G. W. **Expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em linhagens celulares tratadas com inibidor comercial da via JAK-STAT**. 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

INTRODUÇÃO: A desregulação da via de sinalização JAK-STAT é uma característica marcante das neoplasias mieloproliferativas (NMPs), doenças clonais da célula tronco hematopoética, dentre as quais encontra-se a mielofibrose (MF). Diversos inibidores de JAK foram desenvolvidos para o tratamento da MF e encontram-se em diferentes fases de desenvolvimento clínico. Devido ao seu desenvolvimento recente, pouco se sabe a respeito do papel de transportadores de membrana na farmacocinética desses compostos. Essas proteínas realizam o influxo e efluxo celular de substratos endógenos e xenobióticos, e alterações na expressão desses transportadores podem influenciar a resposta a esses fármacos. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito de um inibidor comercial da via JAK-STAT na expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em células HepG2, Caco-2 e HEL92.1.7. **MÉTODOS:** Linhagens de carcinoma hepatocelular (HepG2), adenocarcinoma colorretal (Caco-2) e eritroleucemia humana homozigotas para *JAK2*^{V617F} (HEL92.1.7) foram cultivadas e tratadas o inibidor comercial da via JAK-STAT *JAK Inhibitor I*. Para determinar a concentração ideal para o tratamento com o inibidor, as células foram tratadas com diversas concentrações do inibidor de JAK por 24 horas e foram feitos testes de viabilidade celular e fragmentação do DNA. Com as condições de tratamento padronizadas, foi extraído o RNA total das células e sintetizado o cDNA, para análise das expressões de RNAm dos genes ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 por PCR em tempo real. Foi também avaliada a expressão dos transportadores de efluxo ABCB1 e ABCG2 por citometria de fluxo, utilizando anticorpos primários direcionados a essas proteínas. **RESULTADOS:** Nas células HepG2, foi observado um aumento da expressão de RNAm de *ABCB1* nas células tratadas com 4,00 μM do inibidor de JAK, quando comparado com o controle (células incubadas apenas com o veículo) (P=0,041). Não foi observada alteração da expressão de RNAm de *ABCG2* e *SLC22A1* com o tratamento com o inibidor de JAK nessa linhagem (P>0,05); a expressão de RNAm de *SLCO1A2* não foi detectada nessa linhagem. Nas células Caco-2, a expressão de *ABCB1, ABCG2, SLC22A1* e *SLCO1A2* não se alterou com o tratamento com o inibidor de JAK nas concentrações utilizadas (0,25 μM a 1,00 μM) por 24 horas (P>0,05). Para as células HEL92.1.7, não foi observada diferença na expressão de RNAm de *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1* com o tratamento com 1,00 μM do inibidor de JAK por 24 horas em comparação ao controle (P>0,05); nessa linhagem, a expressão de RNAm de *SLCO1A2* não foi detectada. A expressão proteica dos transportadores ABCB1 e ABCG2 não sofreu alteração com o tratamento com o inibidor de JAK nas condições utilizadas nas três linhagens celulares estudadas (P>0,05). **CONCLUSÕES:** Apenas as células HepG2 apresentaram um aumento da expressão de RNAm do transportador de efluxo ABCB1 em concentrações elevadas do inibidor de JAK, sugerindo que os inibidores de JAK podem modular a expressão do gene desse transportador no fígado. O tratamento com o inibidor da via JAK-STAT não foi associado com alterações na expressão proteica de ABCB1 e ABCG2 em todas as células estudadas.

Palavras-chave: mielofibrose, via de sinalização JAK-STAT, inibidores de JAK, transportadores de membrana, expressão gênica.

ABSTRACT

GOMES, G. W. **Gene expression of drug transporters ABCB1, ABCG2, SLC22A1 and SLCO1A2 in cell lines treated with commercial inhibitor of JAK-STAT pathway.** 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BACKGROUND: JAK-STAT pathway signaling disregulation is a hallmark of myeloproliferative neoplasms (MPN), hematopoietic stem cell clonal diseases, among which is myelofibrosis (MF). Several JAK inhibitors have been developed for MF treatment and are found in different stages of clinical development. Because the recent development of these compounds, the role of drug transporters in their pharmacokinetics is poorly understood. These proteins perform celular influx and effux of endogenous substrates and xenobiotics, and changes in the expression of these drugs transporters may affect the response to these drugs. **AIM:** To evaluate the effect of a JAK-STAT pathway commercial inhibitor in gene expression of drug transporters ABCB1, ABCG2, SLC22A1 and SLCO1A2 in HepG2, Caco-2 and HEL92.1.7 cells. **METHODS:** Hepatocellular carcinoma cell line HepG2, colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2 and human erythroleukemia homozygous *JAK2*^{V617F} cell line HEL92.1.7 were grown and treated with the JAK-STAT pathway inhibitor *JAK Inhibitor I*. In order to determine the optimal concentration for treatment with the inhibitor, cells were treated with several concentrations of JAK inhibitor by 24 hours, and cell viability and DNA fragmentation tests were performed. Once the treatment conditions were standardized, total RNA were obtained from the cells, and cDNA was synthesized in order to evaluate the mRNA expression of ABCB1, ABCG2, SLC22A1 and SLCO1A2 genes, performed by real time PCR. We also evaluate the expression of drug efflux transporters ABCB1 and ABCG2 by flow cytometry, using primary antibodies directed to these proteins. **RESULTS:** In HepG2 cells, it was observed an increase in *ABCB1* mRNA expression in cells treated with 4,00 μM of JAK inhibitor, when compared with controls (cells exposed only to the vehicle) (P=0.041). There was no change in *ABCB2* and *SLC22A1* mRNA expression with the treatment with JAK inhibitor in this cell line (P>0.05); *SLCO1A2* mRNA was not detected in this cell line. In Caco-2 cells, *ABCB1, ABCG2, SLC22A1* and *SLCO1A2* mRNA expression did not change with treatment with the JAK inhibitor at the concentrations used (0.25 μM to 1.00 μM) by 24 hours (P>0.05). In HEL92.1.7 cells, it was not observed differences in *ABCB1, ABCG2* and *SLC22A1* mRNA expression with the treatment with 1 μM of JAK inhibitor by 24 hours when compared with controls (P>0.05); in this cell line, *SLCO1A2* mRNA was not detected. Protein expression of ABCB1 and ABCG2 drug transporters has not changed with treatment with the JAK inhibitor under the conditions used in the three cell lines studied. **CONCLUSIONS:** Only HepG2 cells presented an increase in mRNA expression of drug efflux transporter ABCB1 in presence of high levels of JAK inhibitor, suggesting that JAK inhibitors could modulate this transporter gene expression in liver. Treatment with JAK-STAT pathway inhibitor was not associated with changes in ABCB1 and ABCG2 protein expression in all cell lines studied.

Keywords: myelofibrosis, JAK-STAT pathway signalling, JAK inhibitors, drug transporters, gene expression.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
1.1. Via de sinalização JAK-STAT 19
1.2. Desregulação da via JAK-STAT nas NMPs 22
1.3. Mielofibrose (MF) 24
1.4. Tratamento da mielofibrose 27
1.5. Transportadores de membrana 30
1.5.1. P-gp (ABCB1) 31
1.5.2. BCRP (ABCG2) 32
1.5.3. OCT1 (SLC22A1) 33
1.5.4. OATP1A2 (SLCO1A2) 34
2. OBJETIVOS 35
2.1. Objetivo geral 35
2.2. Objetivos específicos 36
3. MATERIAL E MÉTODOS 36
3.1. Cultivo celular 36
3.2. Tratamento das células com inibidor comercial da via JAK-STAT 37
3.3. Ensaios de viabilidade celular e fragmentação do DNA 38
3.4. Expressão de RNAm dos transportadores 39
3.4.1. Extração e avaliação do RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA) 39
3.4.2. Escolha do gene de referência 39
3.4.3. Determinação da expressão de RNAm dos genes *ABCB1*, *ABCG2*, *SLC22A1* e *SLCO1A2* 40
3.5. Expressão dos transportadores de membrana de efluxo ABCB1 e ABCG2 por citometria de fluxo 41
3.6. Análises estatísticas 42
4. RESULTADOS 43
4.1. Determinação da concentração ideal do inibidor da via JAK-STAT (*JAK Inhibitor I*) para o tratamento das diferentes linhagens celulares (teste de viabilidade celular e fragmentação do DNA) 43
4.2. Efeitos do *JAK Inhibitor I* sobre a expressão de RNAm de ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2. 45
4.2.1. Escolha dos genes endógenos 45
4.2.2. Expressão de RNAm dos genes *ABCB1*, *ABCG2*, *SLC22A1* e *SLCO1A2* após tratamento com inibidor da via JAK-STAT (*JAK Inhibitor I*) 47

4.3. Efeitos do *JAK Inhibitor I* sobre a expressão dos transportadores de efluxo ABCB1 e ABCG2 por citometria de fluxo....50
5. DISCUSSÃO....52
6. CONCLUSÕES....56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....56
ANEXOS....79

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são doenças clonais da célula-tronco hematopoética, caracterizadas pela proliferação aumentada de uma ou mais linhagens da série mieloide com maturação eficaz. Como consequência, podem ocorrer leucocitose, aumento da massa eritrocitária ou trombocitose[1]. Vários tipos de NMP podem progredir para transformação leucêmica ou mielofibrose[2].

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou essas doenças em nove entidades diferentes: leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose (MF) primária, leucemia neutrofílica crônica, leucemia eosinofílica crônica não especificada, mastocitose e NMPs inclassificáveis; destas, a única NMP BCR-ABL1 positiva é a LMC, sendo que as demais são BCR-ABL1 negativas[2; 3]. Essa classificação baseou-se em dois importantes fatores: (1) uso da Biologia Molecular para marcadores genéticos nas NMPs BCR-ABL1 negativas e (2) uso da caracterização histológica como auxílio na identificação dos subtipos das NMPs[4].

1.1. Via de sinalização JAK-STAT

Em 2005, a descoberta da mutação *JAK2*^{V617F}, no domínio autoinibitório de uma proteína com atividade de tirosinoquinase da família Janus quinase (JAK), a JAK2, esclareceu parte das bases moleculares das NMPs e o papel da via JAK-STAT na patogenia dessas doenças.

A JAK2 é membro de uma grande família de tirosinoquinases envolvidas na sinalização de receptores de citocinas, a qual inclui JAK1, JAK3 e TYK2 (tirosinoquinase 2)[5]. A JAK2 é essencial para a sinalização de receptores de fatores de crescimento hematopoéticos, como os receptores de eritropoetina (EPO), trombopoetina (TPO), fator estimulante de colônia granulocítico-macrofágico (GM-CSF), interleucina (IL)-3 e IL-5[6].

Estruturalmente, a JAK2 possui sete domínios homólogos, denominados de JH1 a JH7 (**Figura 1**). O domínio JH1 (quinase), localizado na posição C-terminal, é o responsável pela atividade catalítica da enzima. O domínio JH2 (pseudoquinase) é homólogo ao domínio JH1, porém, não apresenta atividade catalítica. Esse domínio é essencial na modulação da atividade do domínio quinase. Os domínios JH3-JH4 compartilham homologia com o domínio SH2 (do inglês, *Src homology*) das proteínas

transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT). Por fim, o domínio amino terminal JH4-JH7 é conhecido como FERM (do inglês, *four-one, ezrin, radixin and moesin*), e corresponde à região de ligação ao receptor de citocinas[7-9].

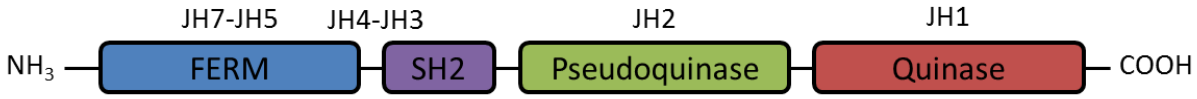


Figura 1. Representação esquemática da estrutura da JAK2.

A proteína JAK2 possui um domínio tirosino quinase (JH1), um domínio pseudoquinase (JH2), um domínio SH2 (JH3-JH4) e um domínio *four-one, ezrin, radixin and moesin* (FERM). O domínio pseudoquinase previne a ativação do domínio quinase. Os domínios JH3-JH4 compartilham homologia com o domínio SH2 da proteína STAT. O domínio FERM é responsável pela ligação aos domínios citosólicos dos receptores de citocinas. Adaptado de Vainchenker e Constantinescu (2013)[9].

Os receptores de citocinas compreendem duas ou mais subunidades, cada uma associada a um monômero de JAK. Após a ligação da citocina a seu receptor apropriado, as subunidades do receptor são reorientadas ou oligomerizadas, facilitando a transfosforilação das JAKs e ativando-as. Em seguida, as JAKs ativadas fosforilam resíduos de tirosina em regiões citoplasmáticas do receptor de citocinas, gerando sítios de ligação para proteínas que contém domínios de reconhecimento de fosfotirosinas, proteínas estas caracterizadas pelo domínio SH2 (na qual estão inclusas as STATs). Dependendo do receptor e dos sítios de ligação gerados pela fosforilação dos receptores, um ou mais membros da família das STATs (STAT1-6) podem ser recrutados[8]; no caso da JAK2, STAT-3 e -5[6]. As STATs são então fosforiladas e se dimerizam, sendo translocadas para o núcleo para iniciar a transcrição de genes efetores envolvidos na regulação do ciclo celular, na apoptose e na degradação proteassomal[6] (**Figura 2**).

A expressão subsequente da serina/treonina quinase Pim favorece a sobrevivência celular ao fosforilar Bad e aumentar a atividade das proteínas antiapoptóticas Bcl2 e Bclx, enquanto o aumento da expressão das ciclinas D1/2 e Cdc25A promovem a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S[6; 10]. A proteína JAK2 também ativa as vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e PI3K/Akt, que promovem proliferação e sobrevivência celulares[6; 7; 11].

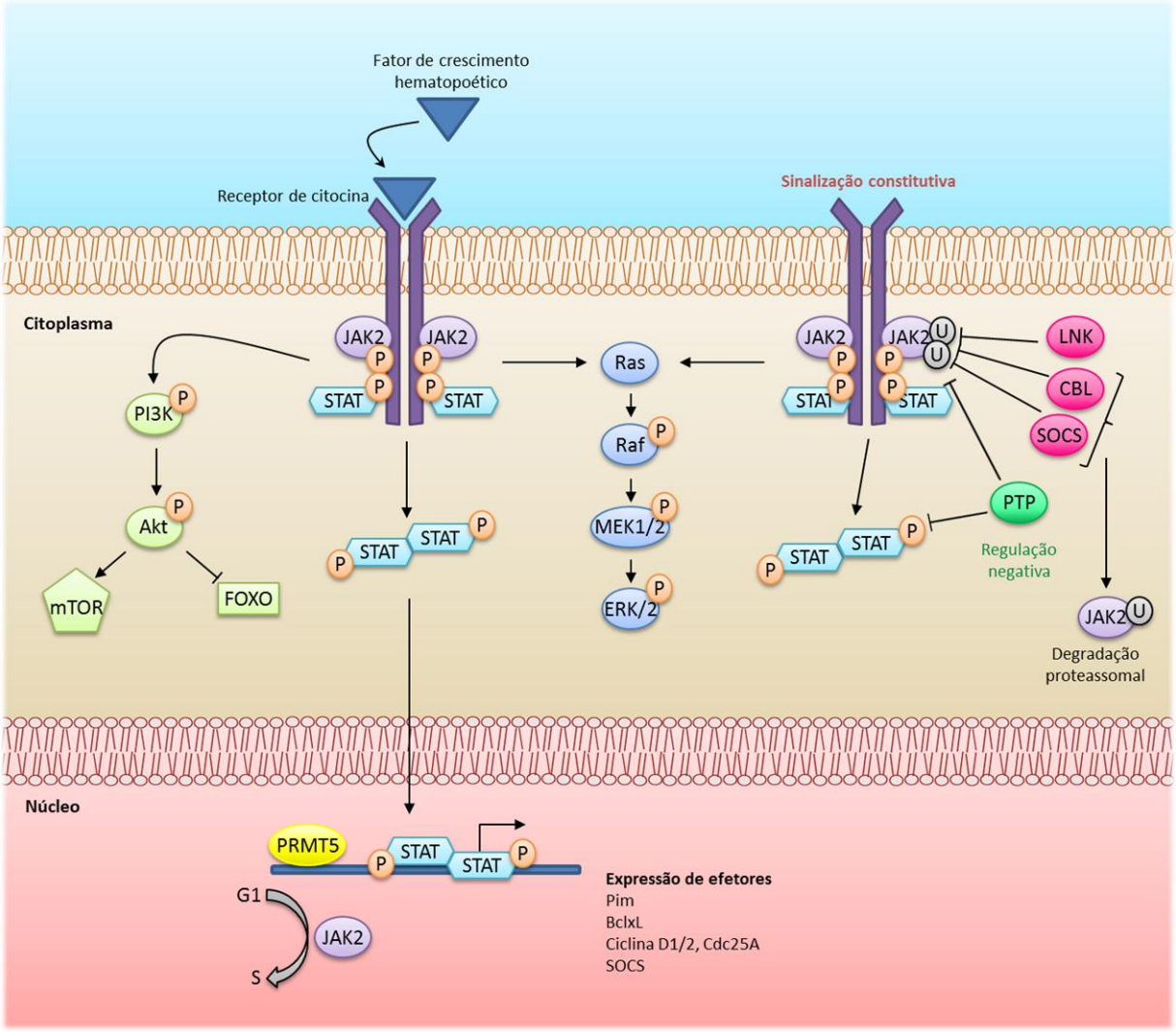


Figura 2. Via de sinalização JAK-STAT em uma célula hematopoética.

A ligação do fator de crescimento hematopoético ao seu receptor de superfície inicia a transfosforilação de JAK2 e a fosforilação de receptores citoplasmáticos de tirosinas. STATs se ligam aos receptores de fosfotirosinas e formam homodímeros e heterodímeros, que translocam-se para o núcleo e induzem a expressão de genes efetores como as proteínas antiapoptóticas Pim e BclxL, ciclinas (promovendo a progressão do ciclo celular) e SOCS. JAK2 também ativa as vias de sinalização da PI3K/Akt e MAPK, promovendo proliferação e sobrevivência celular. Os reguladores negativos SOCS e CBL realizam a ubiquitinação de JAK2, promovendo a sua degradação proteassomal. A LNK sequestra JAK2 por ligação direta, e as PTPs desfosforilam os receptores de citocinas, JAK e STATs. A ativação constitucional da proteína JAK2 induz a ativação da cascata de sinalização JAK-STAT independentemente da ligação de citocinas ao receptor. Adaptado de: Meyer e Levine (2014)[6]

Em contrapartida, a via JAK-STAT é negativamente regulada pela expressão de várias proteínas. As proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS) competem com as STATs pela ligação ao receptor de citocina, promovendo a degradação proteassomal de JAK2 por ubiquitinação e interferindo com a atividade

catalítica via interação com o domínio quinase[12]. A JAK2 também é negativamente regulada pela proteína *Casitas B-cell lymphoma* (CBL), que age como ubiquitina ligase para várias tirosinoquinases, e pela proteína adaptadora LNK (do inglês, *lymphocyte adaptor protein*), que sequestra JAK2[13]. Tirosinofosfatases (PTPs) também agem na regulação negativa da via, atuando na desfosforilação de receptores, JAKs e STATs[6] (**Figura 2**).

Além de ativar a via de sinalização JAK-STAT, a proteína JAK2 também é capaz de translocar-se ao núcleo, fosforilando as histonas H3 e Y41, o que leva ao deslocamento da heterocromatina proteína 1 e PRMT5, uma histona arginina metiltransferase[14; 15]. O impacto da JAK2 sobre as funções do ciclo celular ainda não é completamente compreendido.

A transdução de sinal das citocinas e fatores de crescimento hematopoéticos e de seus receptores é essencial para a proliferação coordenada e para a diferenciação das linhagens celulares a partir da célula pluripotente hematopoética[5; 7; 16].

1.2. Desregulação da via JAK-STAT nas NMPs

A desregulação da via JAK-STAT é uma característica marcante das NMPs BCR-ABL1 negativas (PV, TE e MF), e o primeiro indicativo da importância dessa via nessas doenças foi a descoberta da mutação *JAK2*^{V617F}, em 2005[11; 17-19].

A mutação *JAK2*^{V617F} consiste na troca de uma valina por uma fenilalanina no domínio JH2, posição 617 da proteína JAK2, decorrente da substituição de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 1849, exon 14 do gene *JAK2*[5]. Essa mutação impede a ação de efeitos reguladores negativos mediados pelo domínio JH2, permitindo sua ativação constitutiva, independente do ligante, e a sinalização celular por meio deste caminho torna-se mais robusta, representando o componente proliferativo nas NMPs (**Figura 2**)[5; 20]. Além disso, a *JAK2*^{V617F} escapa do *feedback* negativo realizado por SOCS[6]. Essa mutação acomete cerca de 65% dos pacientes com MF primária, além de 96% de pacientes com PV e 55% dos pacientes com TE[21].

Recentes estudos mostraram que pacientes com TE apresentam a menor carga alélica (*allele burden*) da mutação *JAK2*^{V617F}, pacientes com PV e MF primária apresentam carga alélica intermediária e pacientes com MF secundária apresentam a carga alélica mais elevada[22; 23]. Além disso, a carga alélica de *JAK2*^{V617F} elevada foi associada ao maior risco de eventos trombóticos na TE, ao aumento do risco

cardiovascular e de esplenomegalia na PV, e à leucocitose e ao maior risco de transformação leucêmica na MF primária[24-26]. Entretanto, alguns desses achados são controversos, uma vez que outro estudo não encontrou correlação entre a carga alélica de *JAK2*^{V617F} e a ocorrência de eventos trombóticos[27].

Outras mutações que levam à ativação da via JAK-STAT têm sido identificadas nos pacientes com NMPs não-portadores da mutação *JAK2*^{V617F}. Nos pacientes com PV *JAK2*^{V617F} negativos, por exemplo, mutações *missense* no exon 12 de *JAK2* são identificadas na maioria dos casos[28]. Tais mutações também levam à ativação constitutiva da sinalização JAK-STAT.

Cerca de 5% dos pacientes com TE negativos para *JAK2*^{V617F} apresentam mutações no gene que codifica para o receptor de trombopoetina (*MPL*), sendo W515L ou W515K as mais comuns[29]. Estas mutações também resultam na ativação da sinalização via JAK2. A mutação W515L é ainda encontrada em cerca de 10% dos pacientes com MF não-portadores da *JAK2*^{V617F} [6; 30].

Além disso, mutações em LNK são encontradas em 5% dos pacientes com TE não portadores de mutações em *JAK2* e *MPL*. Cerca de 5% dos pacientes com MF negativos para mutações em *JAK2* e *MPL* apresentam mutações em LNK ou CBL[6; 30].

Recentemente, mutações somáticas no exon 9 do gene da calreticulina (*CALR*), uma chaperona de retículo endoplasmático, foram identificadas em 70 a 84% dos pacientes com TE e MF não portadores de *JAK2*^{V617F} [31; 32]. Essas variantes provocam uma alteração do C-terminal dessa proteína, levando a uma perturbação da sinalização para a retenção de proteinas no reticulo endoplasmático, influenciando a localização subcelular da CALR[31; 32]. Embora os efeitos fisiológicos dessas alterações ainda não estejam claros, os primeiros estudos *in vitro* sugerem uma implicação crítica da ativação de STAT5[31].

Como na MF geralmente ocorre maior carga alélica de *JAK2*^{V617F}, além de essa doença ser associada a um pior prognóstico em relação às demais NMPs[33], os fármacos inibidores da via JAK-STAT foram desenvolvidos primeiramente para o tratamento da MF, embora atualmente estudos clínicos estejam sendo realizados com PV, TE e outras doenças.

1.3. Mielofibrose (MF)

A MF é uma NMP cromossomo Philadelphia negativo, que pode ser primária (idiopática) ou secundária à PV ou à TE[34; 35]. Apresenta uma incidência de 0,5 a 1,5 casos/ 100.000 habitantes/ ano e a sobrevida varia de 3 a 10 anos[34]. A maior parte dos pacientes é diagnosticada com mais de 60 anos de idade[36]. É uma doença caracterizada por fibrose na medula óssea, hematopoese extramedular, esplenomegalia, sobrevida diminuída e sintomas constitucionais, que incluem febre, sudorese noturna, prurido e perda de peso.

Na MF, a proliferação excessiva das células da medula óssea (principalmente megacariócitos) leva à liberação exacerbada de fatores de crescimento e citocinas. Como consequência, ocorrem alterações no microambiente medular que incluem alterações de fibroblastos, expressão alterada de moléculas de adesão e aumento de deposição de componentes da matriz extracelular[37-41]. Acredita-se que fatores de crescimento como o fator plaquetário 4 (PF4), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF)[42-44] e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)[45; 46] ativem as células mesenquimais, levando à fibrose medular, bem como as células endoteliais, contribuindo para a angiogênese. Com o favorecimento da proliferação de células-tronco hematopoéticas, mesenquimais e endoteliais, estas células são mobilizadas da medula óssea para o sangue periférico, e então migram para órgãos como o baço e o fígado, aonde se instalam, proliferam e se diferenciam em células sanguíneas. Esse processo resulta em hematopoese extramedular[47].

Os sinais e sintomas mais comuns da MF são os sintomas constitucionais e as consequências da hematopoese ineficaz. Os sintomas constitucionais ocorrem em decorrência da produção anormal de citocinas[48]. Hepatomegalia e esplenomegalia são consideradas fundamentalmente características da MF, e ocorrem principalmente devido à hematopoese extramedular[47]. Com a progressiva fibrose da medula óssea, podem ocorrer citopenias, particularmente trombocitopenia e anemia, que podem levar, respectivamente, a fenômenos trombohemorrágicos e a sintomas de fadiga, fraqueza, taquicardia e dispneia[49].

O diagnóstico da MF primária é baseado atualmente nos critérios da OMS de 2008[50], e envolve a análise de uma série de características clínicas e laboratoriais. Já o diagnóstico da MF secundária (pós-PV e pós-TE) deve obedecer aos critérios do

International Working Group for MPN Research and Treatment (IWG-MRT) (**Tabela 1**) [51].

A avaliação do prognóstico da MF pode ser realizada de acordo com o *Dynamic International Prognostic Scoring System* (DIPSS) *plus*, um sistema de pontuação que avalia oito fatores de risco independentes (**Quadro 1**), e são utilizados para estratificar os pacientes nas categorias de risco em baixo (ausência dos fatores de risco), intermediário 1 (presença de um fator de risco), intermediário 2 (presença de 2 ou 3 fatores de risco) ou alto (presença de 4 fatores de risco ou mais)[54]. Cada categoria de risco está associada a um diferente tempo médio de sobrevida e a uma diferente conduta de tratamento (**Tabela 2**).

Quadro 1. Fatores de risco para mielofibrose, segundo classificação DIPSS-*plus*

Idade superior a 65 anos
Hemoglobina < 10 g/dL
Leucócitos > 25 × 10^9/L
Blastos circulantes ≥ 1%
Presença de sintomas constitucionais*
Presença de cariótipo desfavorável**
Plaquetas < 100 × 10^9/L
Necessidade de transfusão de eritrócitos

*Presença de febre sem causa determinada, perda de peso maior que 10% em referência ao valor basal e suores excessivos por período maior que 1 mês; **Cariótipo complexo ou único ou 2 anormalidades dentre as seguintes: 8, −7/7q−, i(17q), inv(3), −5/5q− 12p−, ou rearranjo 11q23. DIPSS: *Dynamic International Prognostic Scoring System*. Adaptado de: Tefferi (2011)[19].

Tabela 1. Critérios utilizados no diagnóstico da mielofibrose.

		Mielofibrose primária*		Mielofibrose pós-PV**		Mielofibrose pós-TE**
Critérios maiores	**1**	Proliferação megacariocítica e atipia acompanhada de fibrose colagênica ou reticulínea[a]	**1**	Documentação de diagnóstico prévio de PV como definido pelo critério da OMS	**1**	Documentação de diagnóstico prévio de TE como definido pelo critério da OMS
	2	Não atender os critérios da OMS para LMC, PV, SMD ou outra neoplasia mieloide	**2**	Fibrose medular grau 2-3 (em escala 0-3) ou grau 3-4 (escala 0-4)[b]	**2**	Fibrose medular grau 2-3 (em escala 0-3) ou grau 3-4 (escala 0-4)[b]
	3	Demonstração de *JAK2*^{V617F} ou outro marcador clonal OU ausência de evidência de fibrose medular reativa.				
Critérios menores	**1**	Leucoeritroblastose	**1**	Anemia ou perda sustentada de necessidade de flebotomia na ausência da terapia citorredutiva	**1**	Anemia acompanhada de decréscimo de pelo menos 2 g/dL na concentração de hemoglobina basal
	2	Lactato desidrogenase sérica aumentada	**2**	Quadro de eritroblastose no sangue periférico	**2**	Quadro de eritroblastose no sangue periférico
	3	Anemia	**3**	Esplenomegalia[c]	**3**	Esplenomegalia[c]
	4	Esplenomegalia palpável	**4**	Desenvolvimento de 1 ou mais sintomas constitucionais[d]	**4**	Lactato desidrogenase aumentada
					5	Desenvolvimento de 1 ou mais sintomas constitucionais[d]

PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial; LMC: leucemia mieloide crônica; SMD: síndrome mielodisplásica.
O diagnóstico de mielofibrose primária, pós-PV e pós-TE requer a presença de todos os critérios maiores e pelo menos dois critérios menores.
*Critérios da OMS, 2008; **Critérios do IWG-MRT, 2008.
[a] Na ausência de fibrose reticulínea, as alterações megacariocíticas devem estar acompanhadas por aumento da celularidade da medula óssea e da proliferação granulocítica, além de eritropoese diminuída.
[b] Grau 2-3 de acordo com a classificação europeia[52]. Grau 3-4 de acordo com a classificação padrão[53].
[c] Definida pelo aumento de pelo menos 5 cm na esplenomegalia palpável pré-existente ou pelo aparecimento de esplenomegalia palpável recente.
[d] Sintomas constitucionais: perda de peso >10% no período de 6 meses, suor noturno e febre não esclarecida (>37,5 ºC).
Adaptado de: Tefferi *et al.* (2007)[50] e Barosi *et al.* (2008)[51].

Tabela 2. Categorias de risco segundo a DIPSS-*plus* para o prognóstico da mielofibrose, média de sobrevida e conduta empregada em cada caso.

Categorias de risco segundo DIPSS-*plus*	**Média de sobrevida**	**Conduta empregada**
Baixo (sem fatores de risco)	15,4 anos	Observação ou tratamento convencional*
Intermediário 1 (1 fator de risco)	6,5 anos	Observação ou tratamento convencional* ou tratamento experimental
Intermediário 2 (2 ou 3 fatores de risco)	2,9 anos	Transplante alogênico de células-tronco ou tratamento experimental
Alto (≥ 4 fatores de risco)	1,3 anos	Transplante alogênico de células-tronco ou tratamento experimental

*Preparações de andrógenos ou talidomida associada à prednisona para a anemia; hidroxicarbamida para a esplenomegalia. DIPSS: *Dynamic International Prognostic Scoring System*. Fonte: Tefferi (2012)[20].

1.4. Tratamento da mielofibrose

Até recentemente, as opções terapêuticas para os pacientes com MF consistiam do uso de agentes citorredutores como a hidroxicarbamida, esplenectomia e irradiação esplênica para tratamento da esplenomegalia, e tratamento da anemia com transfusões, agentes estimuladores da eritropoese, andrógenos e imunomoduladores (talidomida, lenalidomida, etc.). Entretanto, tais opções são pouco efetivas, e apenas paliativas, não envolvendo a melhora no curso clínico da doença[33].

O transplante alogênico de células tronco hematopoéticas é, atualmente, a única terapia potencialmente curativa para a MF. No entanto, como a MF ocorre num grupo muito heterogêneo de pacientes, geralmente de idade avançada, e é frequentemente associada a comorbidades, existem dificuldades com a seleção de candidatos ao transplante e ao regime de condicionamento do mesmo[55].

A compreensão do papel da desregulação da sinalização JAK-STAT na patogênese dessa doença levou ao desenvolvimento de fármacos tendo como alvo a inibição da proteína JAK. Vários compostos diferenciando em estrutura e alvo farmacológico estão atualmente em diferentes fases de desenvolvimento clínico, não apenas para o tratamento da mielofibrose, mas também para outras NMPs (**Tabela 3**).

O ruxolitinibe (Jakafi®, Incyte, Wilmington/DE, EUA) é, até o presente momento, o único fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, e pela *European Medicines Agency* (EMA), da União Europeia, para o tratamento da MF primária e secundária de risco intermediário ou alto[6; 56]. No ensaio clínico COMFORT-I, 41,9% dos pacientes do grupo recebendo ruxolitinibe atingiram o desfecho primário de redução de pelo menos 35% no volume do baço após 24 semanas de tratamento, contra 0,7% do grupo placebo (P<0,001)[57]. Em um segundo estudo de fase III, COMFORT-II, 28,5% e 31,8% dos pacientes tratados com este fármaco atingiram o mesmo desfecho primário após 48 e 24 semanas, respectivamente, comparados com 0% dos pacientes recebendo tratamento convencional[58]. Resultados similares foram obtidos em estudos com outros inibidores de JAK. O momelotinibe (Gilead, Foster City/CA, EUA) foi capaz de reduzir o tamanho do baço em pelo menos 50%, em 34% dos pacientes num estudo de fases I/II[59], e 31% dos pacientes com MF tratados com pacritinibe (CTI Biopharma, Seattle/WA, EUA) apresentaram redução esplênica de pelo menos 35% em um estudo de fase II[60].

Tabela 3. Inibidores de JAK em desenvolvimento clínico para o tratamento de neoplasias mieloproliferativas.

Composto	Nome anterior	Alvos	Doença	Estágio	Nome comercial (fabricante)
Ruxolitinibe	INCB018424	JAK1	MF	Aprovado pelo FDA e pelo EMA	Jakafi® (Incyte)
		JAK2	PV	Fase III	
			TE	Fase II	
Momelotinibe	CYT387	JAK1	MF	Fase III	
		JAK2	PV e TE	Fase II	
Pacritinibe	SB1518	JAK2	MF	Fase III	
		FLT3			
Lestaurtinibe	CEP701	JAK2	MF, PV e TE	Fase I/II	
		FLT3			
Gandotinibe	LY2784544	JAK2	MF	Fase III	
			PV e TE	Fase II	
INCB039110		JAK1	MF	Fase II	

MF, mielofibrose; PV, policitemia vera; TE, trombocitema essencial; FDA: *Food and Drug Administration*; EMA: *European Medicine Agency*. Adaptado de: Meyer e Levine (2014)[6] e Mesa, Scherber e Geyer (2015)[61].

Os estudos com os inibidores de JAK também tem revelado sua ação sobre os sintomas da MF. O estudo COMFORT-I revelou melhora em mais que 50% dos escores dos sintomas da MF de acordo com o *Myelofibrosis Symptom Assesment Form* (em uma escala de 0 a 10, onde 0 indica ausência de sintomas e 10 indica sintomas máximos) após 24 semanas de tratamento com o ruxolitinibe, em relação ao grupo placebo (45,9% vs 5,3%, P<0,001)[57]. A redução dos sintomas também foi observada no estudo COMFORT-II[58] e nos estudos de fase I/II com o momelotinibe e o pacritinibe[59; 60].

É importante destacar que os estudos demonstram que o ruxolitinibe é capaz de aumentar a sobrevida dos pacientes com MF, desfecho este que nenhum tratamento anterior foi capaz de promover[57]. No estudo COMFORT-I, foi observada uma sobrevida maior dos pacientes recebendo ruxolitinibe em relação aos que recebiam placebo ao final de quatro meses de tratamento (91,6% vs 84,4%, HR= 0,50, P=0,04)[57]. Dados a respeito da sobrevida de pacientes com MF tratados com outros inibidores de JAK ainda não estão disponíveis, visto que o desenvolvimento desses fármacos é ainda bastante recente.

Sabe-se que a exposição crônica aos inibidores de JAK leva à perda da resposta ao fármaco *in vitro*, em modelos animais e em pacientes com MF[6]. Estudos já identificaram *in vitro*, após exposição crônica ao ruxolitinibe, algumas mutações no domínio quinase do gene JAK2 que conferem resistência ao tratamento e provocam resistência cruzada a outros inibidores de JAK[62; 63]. Até o presente momento, no entanto, nenhuma dessas mutações foi identificada em pacientes resistentes ao tratamento com inibidores de JAK, sugerindo que a sobrevivência do clone NMP, no contexto da inibição crônica de JAK2, independe da presença de mutações em JAK2.

Foi demonstrado que linhagens celulares e granulócitos de pacientes tratados cronicamente com o ruxolitinibe apresentam fosforilação contínua de JAK2, sendo esta relacionada a um aumento da associação entre JAK2 fosforilada e outros membros da família JAK (JAK1 e JAK3)[64]. Além disso, o aumento da expressão de RNAm de JAK2 e o aumento da estabilidade desta proteína contribuem para a heterodimerização entre membros da família JAK. Entretanto, a suspensão do uso do inibidor de JAK leva à ressensibilização à diferentes inibidores de JAK e à perda da associação de JAK2 a outras JAKs[64]. Experimentos com o inibidor de Hsp90 (*heat shock protein 90*) também indicam um possível papel dessa proteína na resistência aos inibidores de JAK[65].

1.5. Transportadores de membrana

Ainda se conhece muito pouco a respeito dos mecanismos envolvidos no influxo e efluxo celular dos inibidores da via JAK-STAT, e não se sabe se essas ações são mediadas por transporte ativo transmembrana, que podem representar mecanismos importantes de resistência ao fármaco e de variabilidade na resposta ao tratamento. Ao que se sabe, até o presente momento, apenas dois estudos avaliaram o papel dos transportadores de membrana (ABCB1 e ABCG2) na farmacocinética dos inibidores de JAK[66; 67].

Os transportadores de membrana são proteínas expressas nas membranas das células que realizam o influxo ou efluxo de substâncias via transporte ativo. Assim, esses transportadores, bem como os genes que os codificam, são determinantes para a captação, biodisponibilidade, eficácia, toxicidade e excreção de diversos fármacos[68]. Diversos estudos têm encontrado associação entre alterações na função desses transportadores e resistência a tratamentos farmacológicos para as mais diversas doenças[69; 70], sobretudo neoplasias[71-74].

As principais proteínas de membrana envolvidas no transporte de fármacos podem ser divididas em dois grupos: os carreadores de soluto (SLC) e os de conjunto de ligação ao ATP (ABC)[75]. Os transportadores do tipo ABC são encontrados em vários organismos vivos e responsáveis pelo efluxo de uma ampla quantidade de diferentes moléculas, sendo que o transporte é diretamente ligado à sua atividade de ATPase[76]. Também são conhecidos como proteínas de resistência a múltiplos fármacos, devido a sua importância na resistência ao tratamento farmacológico do câncer. Os transportadores mais relevantes nesse grupo incluem a glicoproteína-P (P-gp), ou ABCB1, e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP), ou ABCG2[75].

Dentro do grupo de transportadores SLC, existem duas superfamílias gênicas que codificam os principais transportadores de cátion e ânions orgânicos: a superfamília *SLCO*, constituída pelos polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs), sendo que o mais caracterizado é o transportador OATP1A2 (SLCO1A2), e a superfamília *SLC22*, que engloba os transportadores de cátions orgânicos (OCTs), do qual o mais importante é o OCT1 (SLC22A1), e os transportadores de ânions orgânicos (OATs)[77].

1.5.1. P-gp (ABCB1)

A P-gp é um transportador capaz de realizar o efluxo celular de centenas de compostos hidrofóbicos anfipáticos estruturalmente não relacionados, utilizando a energia da hidrólise do ATP[78]. Essa proteína de 170 kDa tem um importante papel fisiológico na proteção dos tecidos contra a toxicidade de xenobióticos e metabólitos endógenos, e também afeta a captação e distribuição de vários fármacos de importância clínica[79]. A alteração da expressão e/ou função da P-gp é considerada um mecanismo para a ocorrência de resistência a múltiplos fármacos[80], fenômeno pelo qual células neoplásicas expostas a antineoplásicos exibem resistência cruzada a outros compostos estrutural e funcionalmente não relacionados[81; 82].

Embora a P-gp seja expressa na maior parte dos tecidos humanos em baixos níveis, ela é encontrada em grandes quantidades na superfície apical das células epiteliais do intestino delgado, do intestino grosso, dos ductos biliares e dos túbulos proximais renais[83], além das células da glândula adrenal, placenta e barreira hematoencefálica[84]. A superexpressão desse transportador tem sido associada, em diversos estudos, a vários tipos de câncer, como leucemia mieloide aguda, tumores da infância, câncer de mama e outras neoplasias hematológicas e tumores sólidos[85; 86; 87; 88].

Sabe-se que os substratos da P-gp variam em tamanho, estrutura e função, englobando desde pequenas moléculas, como cátions orgânicos, carboidratos, aminoácidos e alguns antibióticos, até macromoléculas, como polissacarídeos e proteínas[89]. É importante destacar que diversos fármacos de importância clínica, como antitumorais, imunossupressores e cardiovasculares, são substratos da P-gp[90], e, dado o seu papel na farmacocinética de diversos compostos, variações na expressão e na função desse transportador podem alterar os mecanismos de absorção, de distribuição e de eliminação, o que pode levar à variabilidade na resposta ao tratamento[91].

A P-gp é codificada pelo gene *ABCB1*, anteriormente denominado *MDR1* (do inglês, *multidrug resistance gene 1*), localizado no cromossomo 7q21.12[92], e composto por 27 éxons[93]. A regulação da expressão desse gene é complexa e influenciada por várias vias de sinalização celular e fatores externos[94]. Diversos estudos já demonstraram que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em *ABCB1* podem afetar a expressão e a atividade funcional da P-gp[95; 96]. Em adição aos fatores

genéticos, fatores ambientais, como determinadas condições patológicas[85; 87; 97-99], uso de fármacos[100] e consumo de determinados alimentos[101], também podem influenciar a expressão e a atividade funcional desse transportador.

A capacidade que os mais diferentes tratamentos farmacológicos têm de induzir a expressão e/ou atividade da P-gp já foi evidenciada em vários estudos, principalmente no que se refere aos agentes utilizados para o tratamento do câncer[102-107]. A indução da P-gp é um fenômeno de relevância clínica, pois pode levar ao aumento do efluxo e consequente redução das concentrações intracelulares de um amplo espectro de fármacos antitumorais, prejudicando a eficácia desses compostos[108; 109].

Por exemplo, em estudo realizado por nossa equipe, foi observado que indivíduos com LMC incapazes de atingir a resposta molecular maior ao mesilato de imatinibe, inibidor da tirosinoquinase Bcr-Abl, apresentavam maior atividade de efluxo mediada pela P-gp em leucócitos mononucleares, quando comparados aos indivíduos que atingiram a resposta molecular maior[110]. Além disso, em um estudo com pacientes com LMA submetidos a quimioterapia com daunomicina e citarabina, foi observada uma correlação inversa entre a taxa de remissão completa e a expressão da P-gp em blastos leucêmicos, bem como entre a atividade de efluxo desse transportador e a taxa de remissão completa[111].

1.5.2. BCRP (ABCG2)

O gene *ABCG2* está localizado no cromossomo 4q.22, e consiste de 16 exons e 15 introns. Esse gene foi clonado pela primeira vez por Doyle et al. (1998)[112], a partir de uma linhagem de carcinoma de mama resistente a múltiplos fármacos; por isso, o produto gênico de *ABCG2* é também denominado BCRP (do inglês, *breast cancer resistance protein*). Esse transportador possui um peso molecular de 72 kDa[113], e é mediador de resistência a múltiplos fármacos em vários tipos de câncer, como os de mama, cólon, estômago, pulmão, ovário e melanomas[114-116].

A proteína BCRP é amplamente expressa nos sinciciotrofoblastos placentários, na membrana apical do intestino delgado, no epitélio do cólon, na membrana canalicular do hepatócito e na superfície laminar do endotélio dos vasos que compõem a barreira hematoencefálica[112; 117-119]. Sua ampla distribuição sugere que este

transportador é importante na proteção do feto e do adulto contra toxinas e xenobióticos[78].

A expressão de *ABCG2* é regulada por componentes endógenos, como hormônios esteroides[120-122], e tanto a expressão como a atividade transportadora dessa proteína podem ser afetadas pelo tratamento com diversos fármacos[123-126]. Dado seu papel na proteção celular contra toxinas e xenobióticos, o aumento da expressão e/ou atividade de efluxo de BCRP pode limitar o acúmulo intracelular de diversos compostos, como demonstrado em estudos com diversos fármacos de importância clínica[107; 127; 128]. Essa proteína foi reconhecida pelo FDA como um dos transportadores chave envolvidos na disposição de fármacos de importância clínica, bem como nas interações medicamentosas[129], podendo afetar a resposta a diversos tratamentos farmacológicos.

Já foi demonstrado, por exemplo, que variações na expressão de BCRP foram capazes de modificar os efeitos antitumorais, bem como a absorção e distribuição do gefitinibe, inibidor da tirosinoquinase EGFR utilizado no tratamento de carcinoma de pulmão[130]. Em pacientes com LMA, foi observada associação entre a alta expressão de RNAm de *ABCG2* e menor taxa de remissão completa e/ou menor sobrevida após terapia de indução com citarabina e tioguanida ou etoposídeo[131-134]. Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, maior expressão de RNAm desse transportador de efluxo foi encontrada em pacientes com LMC não respondedores ao mesilato de imatinibe[135]. Outro estudo que incluiu pacientes com essa doença evidenciou maior expressão de RNAm de *ABCG2* em pacientes com menor sobrevida livre de progressão após o tratamento com dasatinibe[124].

1.5.3. OCT1 (SLC22A1)

O gene *SLC22A1*, que codifica para o transportador OCT1, é localizado no cromossomo 6q26, e compreende 11 éxons e 10 íntrons[136-138]. Esse transportador é primariamente expresso na membrana basolateral de hepatócitos[139; 140], o que leva a acreditar que essa proteína tem um papel importante no metabolismo e excreção, mediados pelo fígado, de xenobióticos e substâncias endógenas[91]. Como o OCT1 pode mediar não apenas a captação, mas também o efluxo de substratos, esse transportador também pode estar envolvido na liberação de cátions orgânicos do hepatócito para o sangue[141]. Esse transportador é expresso ainda nos colangiócitos e

na membrana apical das células epiteliais dos túbulos proximal e distal do néfron[141; 142; 143], bem como na membrana basolateral dos enterócitos, o que indica que o OCT1, em conjunto com os transportadores da membrana apical, é responsável pela secreção de cátions orgânicos em direção ao lúmen intestinal[141].

Os mecanismos pelos quais a expressão e a função de OCT1 são regulados são importantes, uma vez que podem alterar a disposição de vários substratos endógenos ou fármacos[144]. Fatores genéticos e epigenéticos contribuem para a variabilidade na expressão desse transportador[142], e determinadas condições patológicas, como a colestase[142], e a exposição a diferentes fármacos[144] podem interferir na expressão de OCT1. Além disso, já foi descrito que tumores primários de células epiteliais do fígado, como hepatocarcinoma celular, colangiocarcinoma e hepatoblastoma, apresentam uma expressão reduzida de OCT1[145].

Diversos estudos já associaram a expressão alterada de OCT1 com variações na resposta ao tratamento e pior prognóstico para diversos tipos de neoplasias. Por exemplo, células derivadas de linfomas que apresentavam expressão de OCT1 eram mais suscetíveis aos efeitos citotóxicos de irinotecam e paclitaxel do que controles OCT1-negativos[146]. A expressão reduzida de OCT1 em tumores de fígado foi associada ao estágio avançado do tumor e a piores prognósticos[143; 147]. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que pacientes com LMC que atingiram a resposta molecular maior ao mesilato de imatinibe apresentaram maior expressão de RNAm de *SLC22A1*[135]. Esse transportador de membrana apresenta um valor preditivo para a resposta molecular a esse fármaco[148].

1.5.4. OATP1A2 (SLCO1A2)

O gene *SLCO1A2* está localizado no cromossomo 12p12, e é composto de 16 exons e 15 introns. O produto codificado por esse gene é o OATP1A2, uma glicoproteína de 670 aminoácidos, que, assim como os demais membros da família OATP, está envolvido na captação de compostos substratos para o interior da célula[149].

A expressão da proteína OATP1A2 já foi confirmada na barreira hematoencefálica[150; 151], na membrana apical dos néfrons distais[151] e enterócitos (estudos sugerem que esse transportador pode facilitar a entrada de compostos substratos na circulação através da parede duodenal)[152], e na membrana apical dos

colangiócitos, células que formam o epitélio dos ductos biliares[151]. Análises de *Northern Blot* foram capazes de detectar as mais altas expressões de RNAm de *SLCO1A2* no cérebro, seguido do rim, fígado, pulmão, testículos e placenta[153; 154].

Essa proteína é capaz de transportar substratos endógenos como ácidos biliares, hormônios tireoidianos e esteroides e seus conjugados[154-157], bem como um amplo espectro de fármacos[158]. A expressão e/ou a atividade transportadora de OATP1A2 pode ser modulada pelo tratamento com diversos fármacos[159-163]. Curiosamente, a atividade desse transportador pode ser inibida pelo consumo dos flavonoides naringina e hesperidina, presentes no suco de *grapefruit* e laranja, respectivamente[164; 165]. É importante compreender os fatores que podem influenciar a expressão e/ou atividade de OATP1A2, uma vez que também poderiam influenciar a resposta ao tratamento farmacológico com compostos que sejam substratos desse transportador.

Vários estudos já demonstraram a influência de OATP1A2 sobre a farmacocinética de diversos fármacos com efeito antitumoral. Em estudo de Yamakawa *et al*. (2011), foi observada maior captação de imatinibe por células HEK293 transfectadas com o gene *SLCO1A2*, quando comparado a seus controles[166]. Camundongos transgênicos para *SLCO1A2* humano submetidos a administração de metotrexato apresentaram menores concentrações deste fármaco no plasma, e maiores no fígado e intestino delgado, quando comparados a camundongos *knockout* (*Slco1a/1b*$^{-/-}$), indicando um importante papel desse transportador na distribuição do metotrexato para os tecidos[167]. Em outro estudo semelhante, foi observada maior razão entre as concentrações de docetaxel no fígado e no plasma de camundongos transgênicos para *SLCO1A2* humano do que em animais *knockout* para esse gene[168].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de um inibidor comercial da via JAK-STAT na expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em diversas linhagens celulares.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar se existe diferença na expressão de RNAm dos transportadores ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em células HepG2 (modelo hepático) e Caco-2 (modelo intestinal), e em células *JAK2*^{V617F} positivas HEL92.1.7 quando tratadas com diferentes concentrações de inibidor comercial da via JAK-STAT;
- Avaliar se existe diferença na expressão dos transportadores de efluxo ABCB1 e ABCG2 por citometria de fluxo em células HepG2, Caco-2 e HEL92.1.7, quando tratadas com diferentes concentrações de inibidor comercial da via JAK-STAT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

Células HepG2 e Caco-2 foram cultivadas e mantidas em meio DMEM (pH 7,4) suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, bicarbonato de sódio 44 mM, estreptomicina 10.000 U/mL e penicilina 10.000 U/mL. As células foram mantidas a 37ºC em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO_2. O meio foi trocado duas vezes por semana e as células tripsinizadas (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%) e subcultivadas uma vez por semana.

Culturas celulares do tipo Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano) têm sido o modelo *in vitro* mais extensivamente caracterizado e utilizado para avaliar a permeabilidade e absorção de fármacos[169]. Essas células mantêm muitas das propriedades morfológicas e funcionais do epitélio intestinal humano *in vivo*[170], além de expressarem uma série de transportadores de efluxo e influxo[171; 172]. Células HepG2 (hepatoma humano) também tem sido utilizadas para avaliar a expressão de transportadores de efluxo pelo fato dessa linhagem conservar as propriedades dos hepatócitos e o fígado ter um papel vital na biotransformação e eliminação de compostos endógenos e exógenos[173]. Assim como nas células Caco-2, as células HepG2 também expressam um amplo espectro de transportadores de membrana[174-176].

A linhagem celular HEL92.1.7 (eritroleucemia humana)[177] foi cultivada em meio RPMI 1640 (pH 7,4) suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM,

bicarbonato de sódio 44 mM, HEPES 10 mM, estreptomicina 10.000 U/mL e penicilina 10.000 U/mL. Para as células HEL92.1.7, o meio foi também suplementado com piruvato de sódio 1 mM. As células foram mantidas a 37ºC em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO_2. O meio foi trocado duas vezes por semana e as células subcultivadas uma vez por semana.

3.2. Tratamento das células com inibidor comercial da via JAK-STAT

As células foram cultivadas na ausência e presença de *JAK Inhibitor I* (Merck/Calbiochem®, Darmstadt, Germany), um potente inibidor de JAKs através da competição pelo sítio de ligação ao ATP; apresenta atividade inibitória potente sobre JAK1 (IC_{50} = 15 nM para JAK1 murina), JAK2 (IC_{50} = 1 nM), JAK3 (K_i = 5 nM), e TYK2 (IC_{50} = 1 nM). Dados sugerem que o *JAK Inhibitor I* inibe a via JAK-STAT (verificada pela inibição da fosforilação de STAT5, AKT e ERK) de linhagens celulares portadoras da mutação *JAK2*^{V617F}, mas não de células sem a mutação[178].

O inibidor foi diluído em DMSO e utilizado para o tratamento das células. Para todos os experimentos do presente estudo, considerou-se como controles as amostras das células incubadas apenas com o veículo (DMSO). A concentração de DMSO final no meio de cultura nunca excedeu 0,5%.

No caso das células HepG2 e Caco-2, foram utilizadas concentrações de 0,25 a 4,00 µM, por um período de 24 horas; a seguir, as células foram submetidas a ensaios de viabilidade celular e fragmentação do DNA. Para as células HEL92.1.7, foi utilizada a concentração de 1,00 µM de *JAK Inhibitor I* por um período de 24 horas para tratamento das células. Estas condições foram padronizadas pelo grupo da Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP; tal padronização baseou-se na verificação da inibição da fosforilação de STAT5 por *Western Blot* **(Figura 3)**.

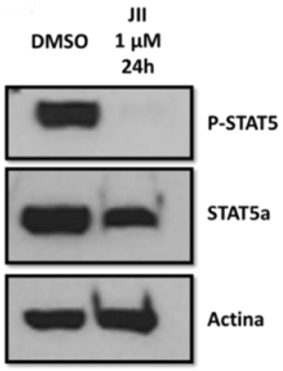


Figura 3. Detecção de STAT5 fosforilada (P-STAT5) nas células HEL92.1.7tratadas com 1,00 µM de *JAK Inhibitor I* por 24h (JII 1 µM 24h) e controles (DMSO).

Observou-se a inibição da fosforilação de STAT5 em ambas linhagens após tratamento com *JAK Inhibitor I* 1,00 µM por 24h em relação aos controles (DMSO). STAT5 e actina utilizados como controle da quantidade de proteína aplicada. JII: *JAK Inhibitor I*.

3.3. Ensaios de viabilidade celular e fragmentação do DNA

Uma suspensão de 0,5 a 1 x 10^5 células foi utilizada para avaliar a porcentagem de células viáveis após tratamento com diversas concentrações do *JAK Inhibitor I* por 24 horas. As células foram incubadas com uma solução de iodeto de propídio (PI) (100 µg/mL de PI em tampão fosfato salino - PBS) por, no máximo, 5 minutos e avaliadas por citometria de fluxo. O PI é um composto fluorescente altamente solúvel em água que se liga diretamente ao DNA intercalando-se entre as bases nitrogenadas, com pouca ou nenhuma preferência por alguma sequência específica, no entanto, não consegue ultrapassar membranas intactas, sendo, portanto, excluído de células viáveis. A perda da integridade de membrana é determinada quando a fluorescência emitida pelo PI aumenta, já que este composto não passa pelas membranas intactas.

A quantificação de DNA fragmentado foi realizada de acordo com metodologia proposta por Nicoletti *et al*. (1991)[179]. Brevemente, cerca de 0,5 a 1 x 10^5 células foram ressuspensas em 300 µL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100) contendo 50 µg/mL de PI e incubadas no escuro a 4 °C *overnight* e, em seguida, utilizadas para a análise de fragmentação do DNA por citometria de fluxo. O PI liga-se às bases nitrogenadas e a fragmentação é observada pelo aparecimento de partículas pouco fluorescentes, evidenciando que o DNA foi clivado. Devido à alta

condensação e pequeno tamanho de fragmentos deste, o PI não consegue ligar-se eficientemente às bases.

As células foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, CA, EUA), utilizando o software Cell Quest (Becton Dickinson, CA, EUA). Como o PI emite fluorescência na faixa da cor laranja, a fluorescência foi determinada através do filtro FL2 (620 nm). Para cada teste, dez mil eventos foram avaliados.

3.4. Expressão de RNAm dos transportadores

3.4.1. Extração e avaliação do RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA)

Cerca de 1 a 3 x 10^6 células de cada linhagem foram utilizadas para a extração do RNA total. As células foram lisadas com 1 mL do reagente de TRIzol® (Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. A integridade do RNA obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed™ (Biotium, Hayward/CA, EUA) e visualizado sob luz UV. Foram consideradas íntegras as amostras com as bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossômico visíveis no gel de agarose. A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm, e a pureza pela razão A_{260nm}/A_{280nm}, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington/DE, EUA).

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada por reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O ensaio foi feito com o kit *High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA), a partir de 1000 ng de RNA total.

3.4.2. Escolha do gene de referência

A análise da expressão de RNAm foi realizada pelo método de quantificação relativa, utilizando genes de referência como controles endógenos. Para as células HepG2 e Caco-2, seis genes candidatos foram testados (**Tabela 4**) com o objetivo de avaliar quais deles são mais estáveis em relação ao tratamento com o *JAK Inhibitor I*. A expressão de RNAm desses genes foi avaliada em amostras obtidas de células tratadas com diversas concentrações de *JAK Inhibitor I*, e os dados foram analisados

pelo programa qbasePLUS, versão 2.4 (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica), baseado no geNorm™[180]. Para as células HEL92.1.7, foram utilizadas as expressões dos genes da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) e beta-actina (*ACTB*) como controles endógenos, conforme descrito por Tognon-Ribeiro (2011)[181].

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA), utilizando os ensaios *Taqman® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) descritos na **Tabela 4**.

A amplificação foi avaliada por monitoração contínua de fluorescência[182].

Tabela 4. Características dos ensaios *Taqman®* utilizados para avaliação da expressão dos genes candidatos pela técnica de PCR em tempo real.

Gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
ACTB	*Homo sapiens*	Hs01060665_g1	63
B2M	*Homo sapiens*	Hs00984230_m1	81
GAPDH	*Homo sapiens*	Hs00266705_g1	74
HMBS	*Homo sapiens*	Hs00609293_g1	62
HPRT1	*Homo sapiens*	Hs02800695_m1	82
UBC	*Homo sapiens*	Hs02800695_m1	135

ACTB, beta-actina; *B2M*, beta-2-microglobulina; *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; *HMBS*, hidroximetilbilano sintase; *HPRT1*, hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *UBC*, ubiquitina C; pb, pares de bases.

3.4.3. Determinação da expressão de RNAm dos genes *ABCB1*, *ABCG2*, *SLC22A1* e *SLCO1A2*

As expressões de RNAm dos genes *ABCB1*, *ABCG2*, *SLC22A1* e *SLCO1A2* foram avaliadas por PCR em tempo real utilizando o sistema *Taqman®* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA). As reações foram realizadas no equipamento *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) utilizando os ensaios *Taqman® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Características dos ensaios *Taqman*® utilizados para avaliação da expressão dos genes em estudo pela técnica de PCR em tempo real.

Gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
ABCB1	*Homo sapiens*	Hs00184500_m1	67
ABCG2	*Homo sapiens*	Hs01053790_m1	83
SLC22A1	*Homo sapiens*	Hs00427552_m1	79
SLCO1A2	*Homo sapiens*	Hs00366488_m1	72

pb, pares de bases.

Os valores quantitativos da expressão dos genes foram obtidos pelos valores do *Cycle Threshold* (C_T) ou limiar da amplificação, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa[183], de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\text{onde: } \Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ \text{amostra tratada}} - \Delta C_{T\ \text{amostra controle}}$$

$$\text{e } \Delta C_T = C_{T\ \text{gene de interesse}} - C_{T\ \text{gene de referência}}$$

Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram realizados controles sem amostra (controle negativo) para avaliar possíveis contaminações dos reagentes com produtos de PCR.

3.5. Expressão dos transportadores de membrana de efluxo ABCB1 e ABCG2 por citometria de fluxo

Uma alíquota de 5 x 10^5 células foi utilizada para os ensaios de citometria de fluxo. As células foram lavadas com 1 mL de PBS e fixadas com 500 µL de formaldeído 3,7% em PBS, por 15 min, em banho de gelo. Após lavagem novamente com PBS, adicionou-se 100 µL do anticorpo primário correspondente à proteína em estudo diluído em PBS. As amostras foram incubadas por 40 min em banho de gelo e protegidas da luz. A seguir, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e, então, foram

adicionados 100 µL da solução de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (anticorpo secundário) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As amostras foram novamente incubadas por 40 min em banho de gelo e protegidas da luz. Os anticorpos utilizados neste ensaio estão listados na **Tabela 6.** Como controles negativos, foram utilizadas células incubadas apenas com o anticorpo secundário.

A leitura foi realizada em equipamento FACSCanto II (Becton Dickinson, CA, EUA), e a análise foi feita utilizando os softwares FACSDiva versão 6.1.3 (Becton Dickinson, CA, EUA) e FlowJo (Tree Star, Ashland/OR, EUA). A intensidade de fluorescência foi avaliada no comprimento de onda de 585 nm, que detecta fluorescência verde (FITC/17F9).

Tabela 6. Características dos anticorpos utilizados no ensaio de detecção dos transportadores de membrana por citometria de fluxo.

Anticorpo	**Nº. de catálogo (Empresa)**	**Origem**
Anti-glicoproteína-P humana	557001 (BD Pharmingen™)	Monoclonal de camundongo
Anti-ABCG2 humano, 5D3	sc-18841 (Santa Cruz Biotechnology®)	Monoclonal de camundongo
Anti-IgG de camundongo – FITC	sc-2010 (Santa Cruz Biotechnology®)	Policlonal de cabra

BD Pharmigen™, Becton Dickinson, CA, EUA; Santa Cruz Biotechnology®, Dallas/TX, EUA.

3.6. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados no software GraphPad PRISM® 5 for Windows (GraphPad Software, La Jolla/CA, EUA). Para cada linhagem celular, as comparações entre os grupos tratados com diferentes concentrações do *JAK Inhibitor I* foram realizadas usando o teste de Kruskal-Wallis e/ou o teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi $P<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da concentração ideal do inibidor da via JAK-STAT (*JAK Inhibitor I*) para o tratamento das diferentes linhagens celulares (teste de viabilidade celular e fragmentação do DNA)

A. HepG2

O tratamento com o *JAK Inhibitor I* nas concentrações entre 0,25 a 4,00 µM, pelo período de 24 horas, não afetou a viabilidade das células HepG2. A **Figura 4** apresenta os histogramas obtidos para as células controle (0 µM) e tratadas com 4,00 µM. É possível observar que não houve perda da integridade de membrana com nenhum dos grupos (células controle e tratadas com diferentes concentrações do inibidor) no período de 24 horas (P= 0,397) (**Figura 5(A)**), mostrando que essas condições são adequadas para os experimentos a serem realizados.

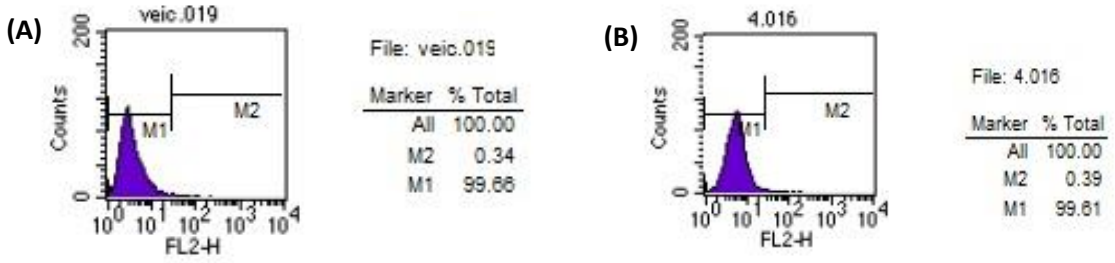


Figura 4. Análise de viabilidade celular de HepG2 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*).

(A) Histograma das células incubadas com o veículo; **(B)** Histograma das células tratadas com 4,00 µM do inibidor de JAK. A análise foi realizada após 24 horas de tratamento. A região M1 representa a baixa fluorescência emitida pelas células com a membrana íntegra (viáveis) enquanto a região M2 representa a alta fluorescência emitida pelas células com perda da integridade de membrana (inviáveis).

Não houve diferenças em relação à quantidade de DNA fragmentado entre as células HepG2 tratadas nas diversas concentrações do *JAK Inhibitor I* (0,25 a 4,00 µM) pelo período de 24 horas em relação ao controle (P= 0,345) (**Figura 6(B)**), demonstrando que essas condições são adequadas aos experimentos a serem realizados.

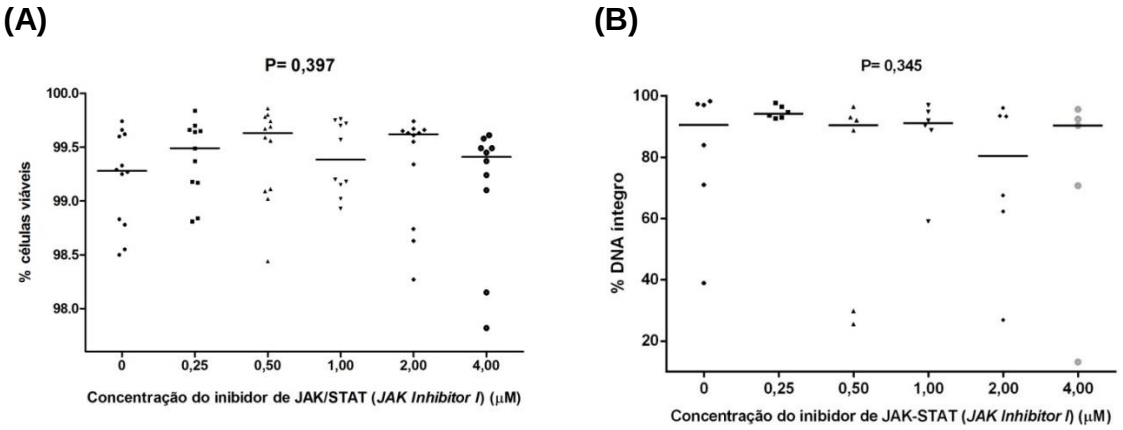


Figura 5. Efeito do inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*) sobre a viabilidade **(A)** e a fragmentação do DNA **(B)** das células HepG2.

A comparação dos grupos de tratamento foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis. A concentração 0 µM representa as amostras controle (incubadas com o veículo).

B. Caco-2

Em relação às células Caco-2, foi possível observar que a porcentagem de células viáveis foi diferente antes e após o tratamento com *JAK Inhibitor I* por 24 horas (P< 0,001). Não foi observada perda de viabilidade nas células tratadas com 0,25 a 1,00 µM. Entretanto, nas concentrações de 2,00 e 4,00 µM, foi encontrada uma significativa perda da viabilidade em relação ao controle (0 µM) (**Figura 6(A)**), o que demonstra que essas duas concentrações são inadequadas para os experimentos a serem realizados.

Já os dados dos ensaios de fragmentação do DNA mostram que o tratamento não interferiu na integridade do DNA das células Caco-2 (P=0,698) (**Figura 6(B)**). Portanto, as condições de tratamento utilizadas para as células Caco-2 foram: concentrações do *JAK Inhibitor I* de 0 a 1,00 µM por um período de 24 horas.

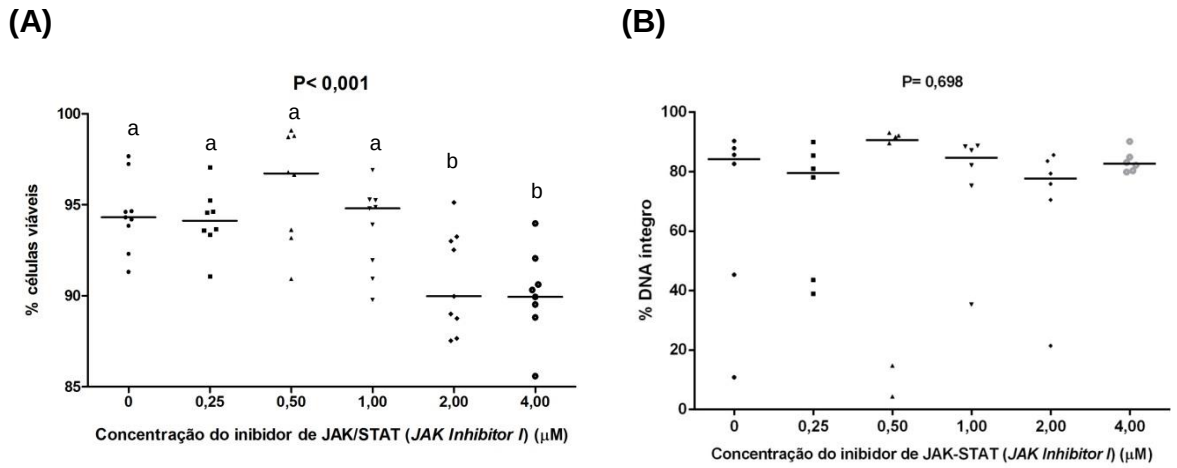


Figura 6. Efeito do inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*) sobre a viabilidade **(A)** e a fragmentação do DNA **(B)** das células Caco-2.

A comparação das medianas dos seis grupos de tratamento com inibidor foi feita utilizando o teste de Kruskal-Wallis; quando significativo, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunn. Letras diferentes representam diferenças significantes entre os grupos.

C. HEL92.1.7

Para essa linhagem, a determinação da concentração do *JAK Inhibitor I* adequada foi padronizada de acordo com a capacidade de inibição da via JAK-STAT verificada pela fosforilação de STAT5 por *Western Blot*, como anteriormente descrito no item **3.2**. Assim, a melhor condição de tratamento para inibir a via JAK-STAT em células HEL92.1.7 foi o uso de 1,00 µM do inibidor pelo período de 24 horas.

4.2. Efeitos do *JAK Inhibitor I* sobre a expressão de RNAm de ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2.

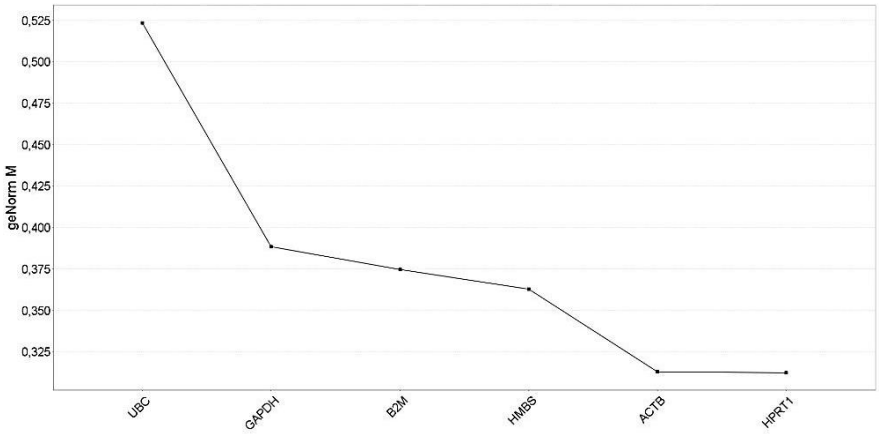
4.2.1. Escolha dos genes endógenos

De acordo com análise do software qbasePLUS, o gene considerado com menor estabilidade de expressão (maior valor de M) para as amostras obtidas de HepG2 foi o *UBC* (M= 0,523); os genes com estabilidade intermediária foram *GAPDH* (M= 0,388), *B2M* (M= 0,375) e *HMBS* (M= 0,363); e os genes com maior estabilidade foram *ACTB* (M= 0,313) e *HPRT1* (M= 0,312) (**Figura 7(A)**). Assim, foram selecionados os genes *ACTB* e *HPRT1* como controles endógenos para as amostras de HepG2.

Para a linhagem Caco-2, o gene com menor estabilidade de expressão foi o *HMBS* (M= 0,516); os genes com estabilidade intermediária foram *ACTB* (M= 0,447),

HPRT1 (M= 0,381) e *UBC* (M= 0,318); e os genes com maior estabilidade foram *GAPDH* (M= 0,287) e *B2M* (M= 0,264) (**Figura 7(B)**). Portanto, para essa linhagem, os genes selecionados como controles endógenos foram *GAPDH* e *B2M*.

(A)



(B)

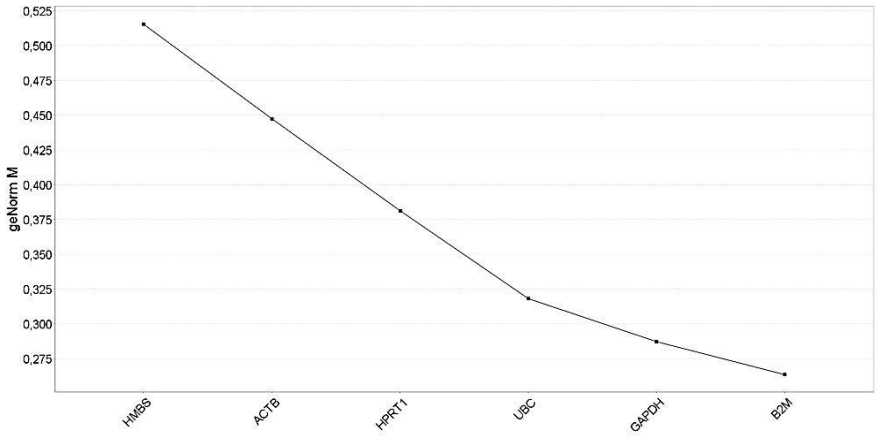


Figura 7. Valores de estabilidade de expressão média (M) para os genes candidatos nos ensaios com células **(A)** HepG2 e **(B)** Caco-2.

ACTB, beta-actina; *B2M*, beta-2-microglobulina; *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; *HMBS*, hidroximetilbilano sintase; *HPRT1*, hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *UBC*, ubiquitina C.

Conforme citado anteriormente (item **3.4.2.**), os genes endógenos escolhidos para avaliar a expressão de RNAm em células HEL92.1.7 foram selecionados de acordo com o descrito por Tognon-Ribeiro (2011)[181]. Portanto, para essas linhagens os controles endógenos utilizados foram *GAPDH* e *ACTB*.

4.2.2. Expressão de RNAm dos genes *ABCB1*, *ABCG2*, *SLC22A1* e *SLCO1A2* após tratamento com inibidor da via JAK-STAT (*JAK Inhibitor I*)

A. HepG2

A expressão de RNAm de *ABCB1* encontrada nas células HepG2 após o tratamento com o *JAK Inhibitor I* na concentração de 4,00 µM por 24h foi 2,3 vezes maior do que nos controles (0 µM). Não foram observadas diferenças na expressão de RNAm de *ABCB1* com o uso de concentrações de 0,25 a 2,00 µM do inibidor de JAK (**Figura 8(A)**).

O tratamento com o *JAK Inhibitor I* não alterou a expressão de RNAm de *ABCG2* e *SLC22A1* nas células HepG2, nas condições utilizadas (0,25 µM a 4,00 µM por 24h) (**Figura 8(B)** e **(C)**). Não foi detectada a expressão de RNAm de *SLCO1A2*, tanto nas células submetidas ao tratamento com o *JAK Inhibitor I* como nas células controle.

B. Caco-2

Não foi observada diferença na expressão de RNAm dos transportadores de efluxo ABCB1 e ABCG2 nas células Caco-2 com o tratamento com o *JAK Inhibitor I* nas condições utilizadas (**Figura 9(A)** e **(B)**). De forma semelhante, o tratamento com o inibidor da via JAK-STAT não alterou a expressão de RNAm dos genes dos transportadores SLC22A1 e SLCO1A2 (**Figura 9(C)** e **(D)**).

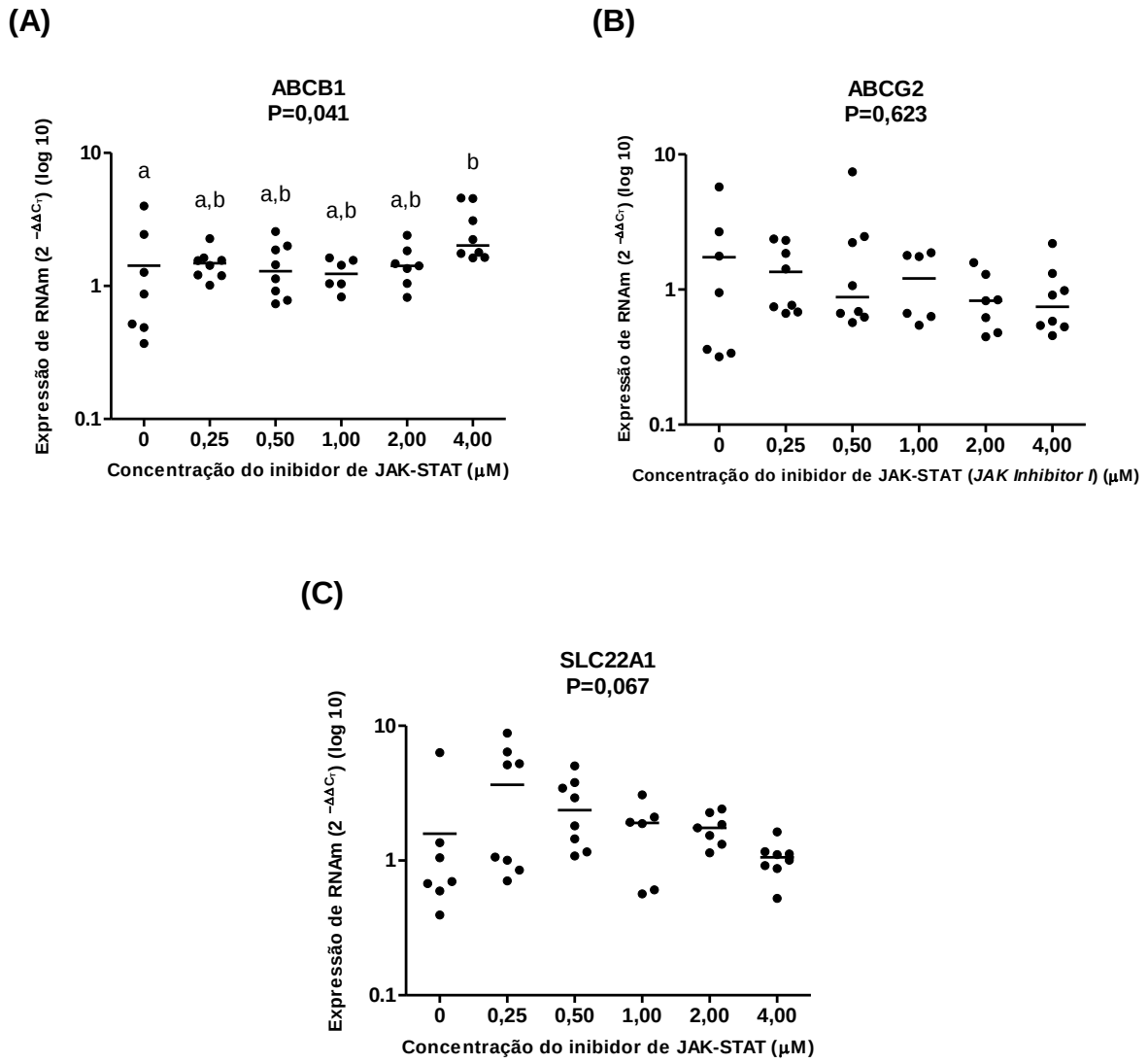


Figura 8. Expressão de RNAm dos transportadores **(A)** ABCB1, **(B)** ABCG2 e **(C)** SLC22A1, em células HepG2 tratadas com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*).

A concentração 0 µM corresponde às amostras controle, incubadas com o veículo (DMSO). A comparação dos seis grupos foi feita pelo Teste de Kruskal-Wallis; quando significativo, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunn. Letras diferentes representam diferenças significantes entre os grupos.

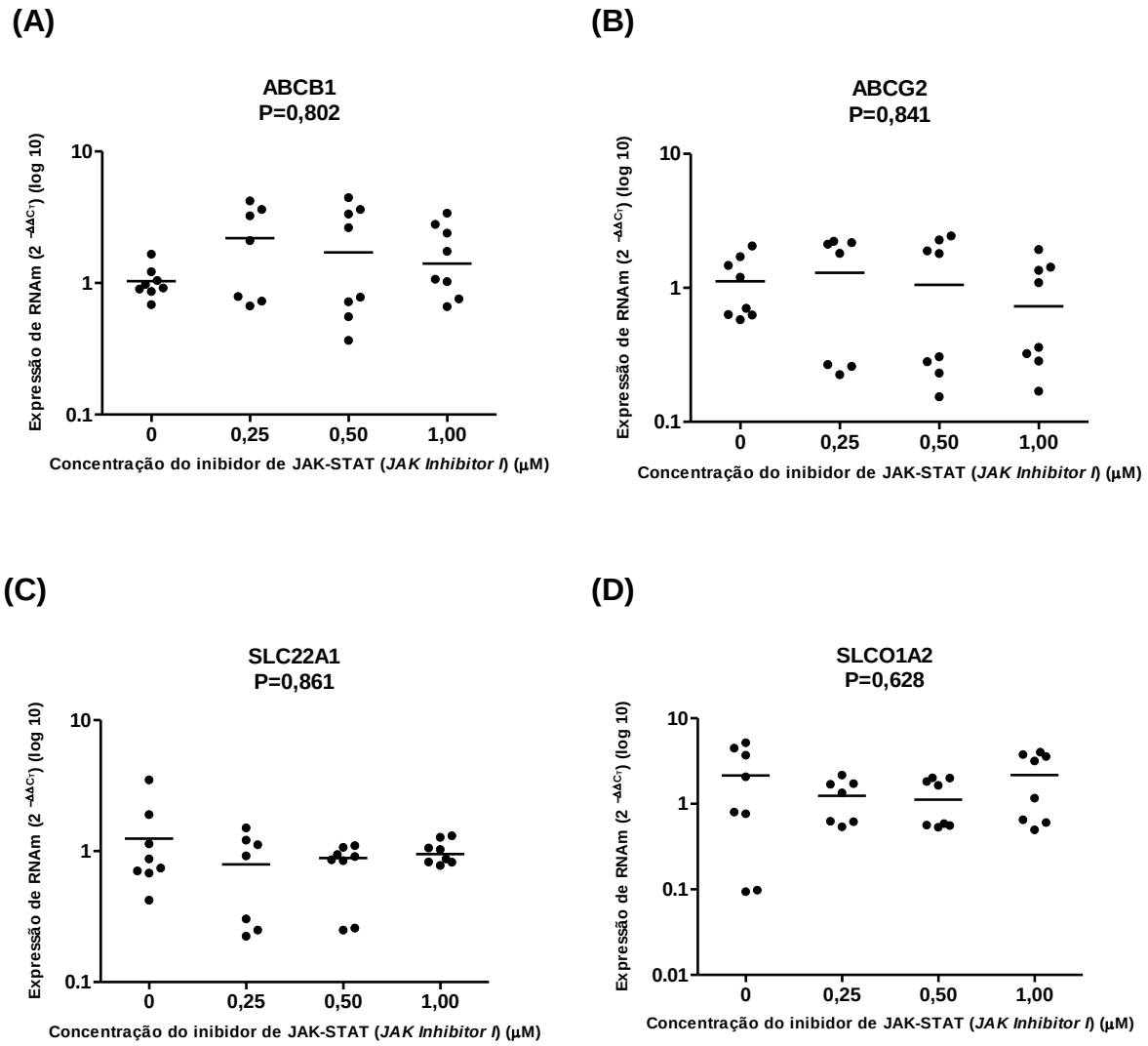


Figura 9. Expressão de RNAm dos transportadores **(A)** ABCB1, **(B)** ABCG2, **(C)** SLC22A1 e **(D)** SLCO1A2 em células Caco-2 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*).

A comparação dos quatro grupos de tratamento com o inibidor foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis. A concentração 0 µM corresponde às amostras controle, incubadas com o veículo (DMSO).

C. HEL92.1.7

A expressão de RNAm dos genes *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1* não foi alterada com o tratamento com *JAK Inhibitor I* nas células HEL92.1.7 (**Figura 10**). A expressão de RNAm de *SLCO1A2* não foi detectada nessa linhagem.

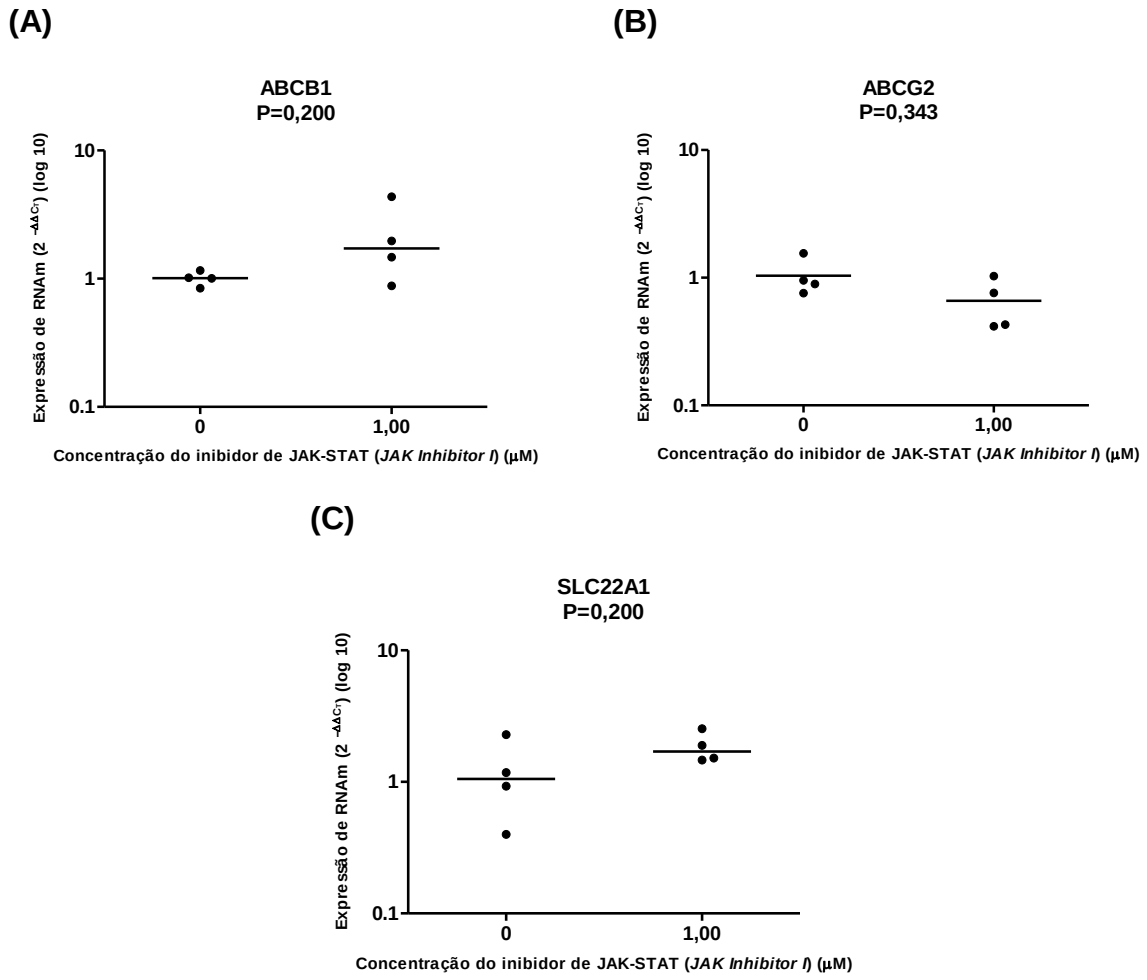


Figura 10. Expressão de RNAm dos transportadores **(A)** ABCB1, **(B)** ABCG2 e **(C)** SLC22A1, em células HEL92.1.7 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*).

A concentração 0 µM corresponde às amostras controle, incubadas com o veículo (DMSO). A comparação dos grupos foi feita pelo Teste de Mann-Whitney.

4.3. Efeitos do *JAK Inhibitor I* sobre a expressão dos transportadores de efluxo ABCB1 e ABCG2 por citometria de fluxo

A. HepG2

Não foi observada diferença na expressão proteica dos transportadores de efluxo ABCB1 e ABCG2 nas células HepG2 com o tratamento com o *JAK Inhibitor I* nas condições utilizadas, conforme demonstrado na **Figura 11**.

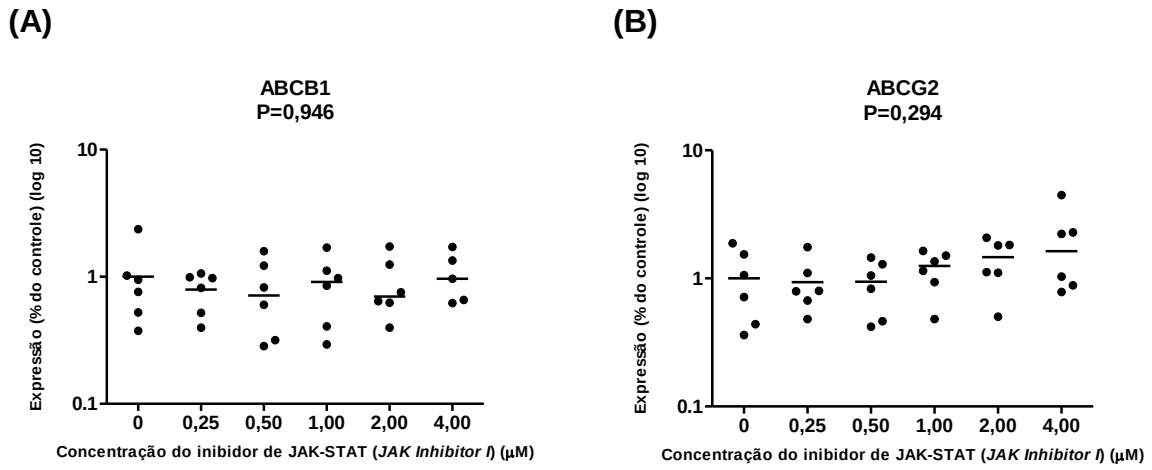


Figura 11. Expressão dos transportadores **(A)** ABCB1 e **(B)** ABCG2 em células HepG2 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*).

A concentração 0 µM corresponde às amostras controle, incubadas com o veículo (DMSO). A comparação dos seis grupos foi feita pelo Teste de Kruskal-Wallis.

B. Caco-2

O tratamento com o *JAK Inhibitor I* não alterou a expressão proteica de ABCB1 e ABCG2 nas células Caco-2, nas condições utilizadas (0,25 µM a 1,00 µM por 24h) (**Figura 12**).

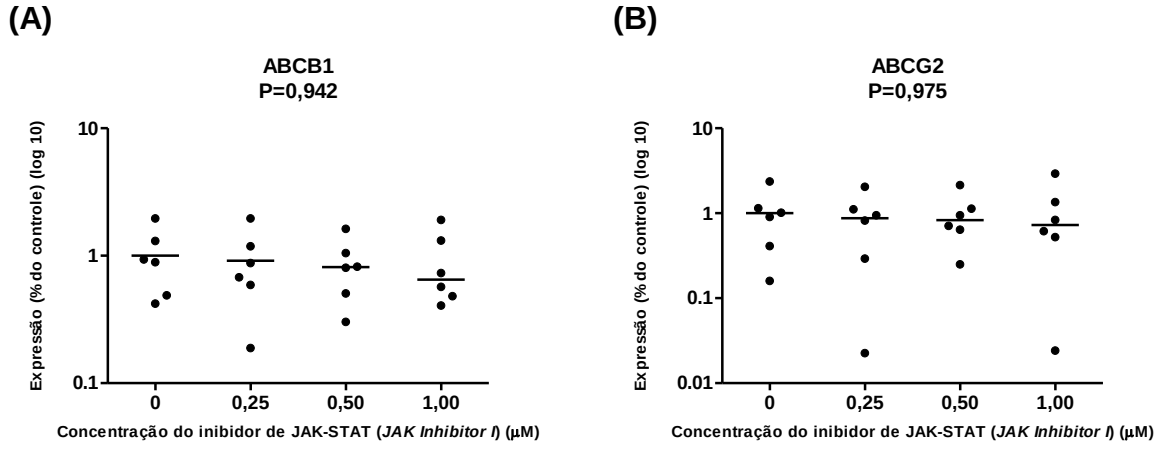


Figura 12. Expressão dos transportadores **(A)** ABCB1 e **(B)** ABCG2 em células Caco-2 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*).

A concentração 0 µM corresponde às amostras controle, incubadas com o veículo (DMSO). A comparação dos seis grupos foi feita pelo Teste de Kruskal-Wallis.

C. HEL92.1.7

A expressão proteica dos transportadores ABCB1 e ABCG2 não foi alterada com o tratamento com 1,00 µM do inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*) por 24h **(Figura 13)**.

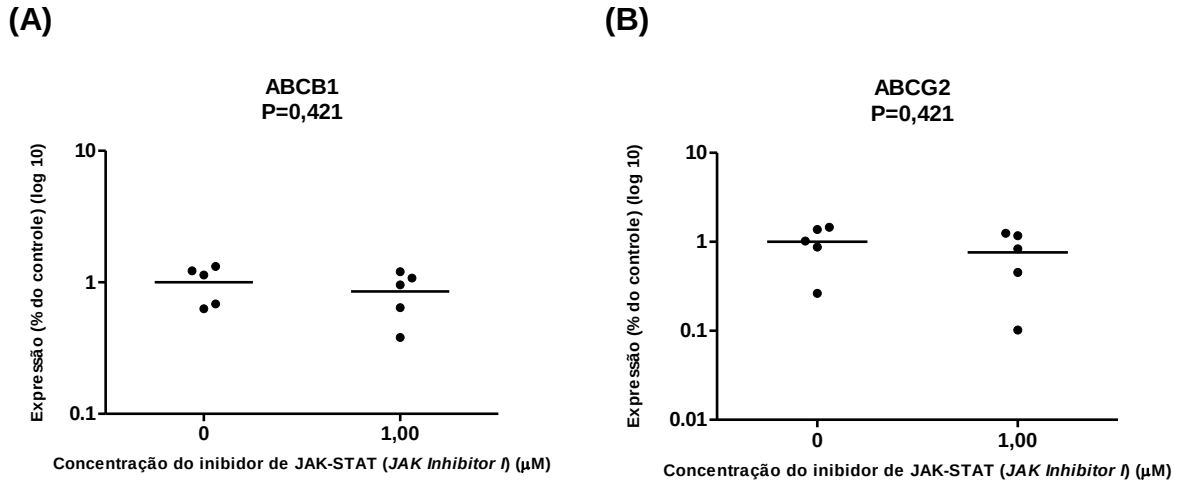


Figura 13. Expressão dos transportadores **(A)** ABCB1 e **(B)** ABCG2 em células HEL92.1.7 após tratamento com o inibidor da via JAK/STAT (*JAK Inhibitor I*).

A concentração 0 µM corresponde às amostras controle, incubadas com o veículo (DMSO). A comparação dos grupos foi feita pelo Teste de Mann-Whitney.

5. DISCUSSÃO

Embora a descoberta da mutação *JAK2*^{V617F} tenha sido importante para a compreensão da fisiopatologia da MF, bem como das demais NMPs BCR-ABL1 negativas, sabe-se que a desregulação da via de sinalização JAK-STAT é uma característica marcante nessas doenças, independentemente do estado mutacional de *JAK2*[184]. Diversos fármacos tendo como alvo a inibição da via JAK-STAT têm sido desenvolvidos para o tratamento da MF, e tem demonstrado efeitos benéficos sobre a esplenomegalia, sintomas e sobrevida dos pacientes com essa doença[57-60].

O estudo da farmacocinética dos medicamentos é importante, uma vez que ela determina a manutenção de concentrações adequadas do fármaco ao alvo farmacológico e, consequentemente, a resposta ao tratamento. Nesse contexto, os transportadores de membrana têm um papel fundamental, uma vez que realizam o efluxo e/ou a captação de substâncias endógenas e xenobióticos através da

membrana da célula, podendo, assim, modular a absorção, distribuição e eliminação de fármacos substratos[68].

O papel dos transportadores de membrana na farmacocinética dos inibidores de JAK é pouco discutido na literatura, uma vez que o desenvolvimento desses fármacos é relativamente recente. Dados *in vitro* sugerem que o ruxolitinibe não é substrato da P-gp[66]. Entretanto, já foi demonstrado que o momelotinibe é transportado eficientemente pela P-gp e pela BCRP[67], sugerindo que alterações na expressão e/ou atividade desses transportadores poderiam influenciar a farmacocinética desses fármacos e possivelmente interferir na resposta farmacológica ao tratamento.

Nos hepatócitos humanos, a P-gp (ABCB1) está localizada na membrana canalicular, que representa o polo excretório desse tipo celular[185]. Devido a sua localização, atribui-se a P-gp o papel de realizar a eliminação biliar de diversos fármacos e outras substâncias[186]. No presente estudo, observou-se um aumento da expressão de RNAm desse transportador nas células HepG2 (modelo de hepatócito) com o tratamento com 4,00 µM do inibidor de JAK após 24 horas. Sendo assim, a indução da expressão da P-gp poderia levar ao aumento da eliminação biliar de fármacos substratos, o que poderia representar um mecanismo de variabilidade de resposta ao tratamento. Entretanto, no nosso estudo não foi observada diferença na expressão proteica da P-gp com o tratamento com o inibidor de JAK por 24 horas. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de o uso crônico do inibidor aumentar a expressão proteica da P-gp, uma vez que o tratamento único por 24h foi capaz de elevar a expressão de RNAm de *ABCB1*.

Nas células Caco-2 (modelo de enterócito), o tratamento com o inibidor da via JAK-STAT não modificou alterou a expressão gênica (RNAm e proteína) de *ABCB1*, o que sugere que a exposição a doses crescentes deste fármaco não leva à indução ou repressão da expressão dessa bomba de efluxo. Sabe-se que a expressão da P-gp no intestino é capaz de limitar a biodisponibilidade oral de diversos fármacos substratos, uma vez que o intestino é um órgão com papel central na absorção de fármacos de administração oral[187]. Sendo assim, é possível que o tratamento não modifique a biodisponibilidade de fármacos substratos via modulação da expressão de *ABCB1* no intestino.

De forma semelhante, nas células de eritroleucemia homozigotas para a mutação *JAK2*^{V617F}, HEL92.1.7, a inibição da via JAK-STAT não interferiu na expressão gênica de *ABCB1* (RNAm e proteína). Sabe-se que o aumento da

expressão e/ou atividade desse transportador em células tumorais pode levar ao aumento do efluxo e, consequentemente, à redução das concentrações intracelulares de fármacos antitumorais, influenciando a eficácia desses compostos[108; 109]. Deste modo, nosso resultados sugerem que, provavelmente, o tratamento com os inibidores de JAK não induzem a expressão de ABCB1 nas células alvo, o que poderia representar um mecanismo de resistência ao fármaco.

De maneira semelhante a P-gp, a proteína BCRP (ABCG2) também é expressa na membrana canalicular dos hepatócitos e na membrana apical das células do epitélio do intestino delgado e cólon[118]. Esses achados sugerem que, assim como a P-gp, a BCRP também apresenta um importante papel na eliminação hepática e na limitação da biodisponibilidade oral de compostos substratos desse transportador[118]. No entanto, nos tipos celulares de intestino (Caco-2) e hepático (HepG2), a expressão desse transportador (RNAm e proteína) também não foi afetada pelo inibidor da via JAK-STAT.

Acredita-se que a BCRP tenha um papel importante na resistência farmacológica nas neoplasias hematológicas, uma vez que a expressão desse transportador é frequentemente encontrada em células hematopoéticas neoplásicas[188-191], e que muitos fármacos antineoplásicos são substratos de BCRP[192]. No entanto, a inibição da via JAK-STAT nas células HEL92.1.7, *JAK2*^{V617F} positivas não provocou alteração na expressão de RNAm de ABCG2. Tal observação é um indicativo de que a inibição da via JAK-STAT não oferece potencial de resistência farmacológica via expressão desse transportador nas células de NMPs.

No trato gastrointestinal inferior, a proteína OCT1 (SLC22A1) tem a atividade de liberar cátions orgânicos do meio intracelular para o interstício da mucosa, atingindo a circulação sanguínea[193], o que é condizente com a localização desse transportador na porção apical da membrana lateral dessas células[193]. Não foi observada diferença na expressão de RNAm de *SLC22A1* com o tratamento com o inibidor de JAK-STAT nas células Caco-2, sugerindo que a absorção de compostos substratos mediada por este transportador não é influenciada pelo tratamento.

Nos hepatócitos, o OCT1 representa a primeira etapa na detoxificação de compostos endógenos e xenobióticos, uma vez que realiza a captação de compostos através da membrana sinusoide para o meio intracelular, onde ocorre a biotransformação dessas substâncias[141]. Além disso, esse transportador também pode estar envolvido na liberação de cátions orgânicos do hepatócito para o

sangue[141]. De forma semelhante ao observado para as células Caco-2, não houve diferença significativa na expressão de RNAm de *SLC22A1* nas células HepG2 tratadas nas diversas concentrações de inibidor de JAK quando comparado com os controles.

Ao que se sabe, esse é o primeiro estudo que avaliou a expressão de RNAm de *SLC22A1* em células de NMPs BCR-ABL1 negativas. Contudo, foi demonstrado em leucócitos de pacientes com LMC, bem como em linhagens celulares derivadas dessa doença, que esse transportador tem um importante papel na captação celular de mesilato de imatinibe[194; 195], sugerindo que o transportador OCT1 pode ser determinante na manutenção de concentrações intracelulares de fármacos substratos em células hematológicas. Nas células HEL92.1.7, entretanto, não foi observada alteração da expressão de RNAm de *SLC22A1* com o tratamento com o inibidor da via JAK-STAT.

A expressão de RNAm do transportador OATP1A2 (SLC22A1) foi detectada apenas na linhagem Caco-2 no presente estudo, e o tratamento dessas células com o inibidor da via JAK-STAT não alterou a expressão desse transportador. Uma vez que esse transportador é expresso na borda em escova dos enterócitos no duodeno, acredita-se que ele tenha o papel de modular a absorção de compostos substratos[196]. Sendo assim, nossos resultados sugerem que a exposição aguda aos inibidores de JAK não interfere com a absorção de compostos substratos de OATP1A2, uma vez que não modula sua expressão no intestino.

A intensidade da expressão de OATP1A2 no fígado é bastante controversa. Em estudo de Kullak-Ublick *et al*. (1995), esse transportador foi clonado a partir de um banco de cDNA de fígado humano, sugerindo um papel na captação hepática de compostos provenientes da circulação[154]. No entanto, análises imunohistoquímicas não detectaram a expressão de OATP1A2 em hepatócitos humanos[151]. Em relação às células HepG2, embora alguns estudos tenham detectado a expressão de RNAm de *SLCO1A2* [197; 198], outros não detectaram a expressão de RNAm desse transportador nessa linhagem celular[199; 200]. Corroborando com esses últimos estudos, não foi encontrada expressão de RNAm de *SLCO1A2* nas células HepG2. Assim como nas células HepG2, não foi detectada a expressão de RNAm de *SLCO1A2* nas células HEL92.1.7.

É importante destacar que, embora a introdução do tratamento da MF com inibidores de JAK-STAT seja recente, a resistência ao tratamento já é descrita na

literatura[6]. A perda da resposta ao tratamento foi observada tanto *in vitro* como em modelos animais e pacientes com MF. Embora algumas mutações no gene JAK2 que conferem resistência aos inibidores de JAK tenham sido descritas *in vitro*[59; 60], até o momento essas mutações não foram identificadas em pacientes resistentes aos inibidores de JAK. Isso sugere que a resistência pode ser mediada, provavelmente, por mecanismos independentes de mutações em JAK2, alvo dos inibidores de JAK.

Este estudo é de grande valia, pois a introdução da terapia com inibidores da via JAK-STAT é muito recente e as informações sobre o impacto desses transportadores na farmacocinética desses inibidores é muito restrita. A elucidação desses fatores poderia ajudar a compreender melhor os mecanismos que podem levar à resistência aos inibidores de JAK e, consequentemente, ajudar na estratégia terapêutica para contornar esse problema.

6. CONCLUSÕES

- Apenas as células HepG2 apresentaram um aumento da expressão de RNAm do transportador de efluxo ABCB1 com o tratamento com o inibidor de JAK na concentração de 4,00 µM por 24 horas, diferentemente do que ocorreu nos demais tipos celulares (Caco-2 e HEL92.1.7);
- O tratamento com o inibidor da via JAK-STAT, nas concentrações e tempo utilizados, não foi associado com alterações na expressão proteica dos transportadores ABCB1 e ABCG2 nas células HepG2, Caco-2 e HEL92.1.7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] SPIVAK, J. L. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. **Semin Hematol,** v. 41, n. 2 Suppl 3, p. 1-5, 2004.

[2] CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Myeloproliferative neoplasms: a review of diagnostic criteria and clinical aspects. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.,** v. 32, n. 4, p. 308-316, 2010.

[3] WADLEIGH, M.; TEFFERI, A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. **Int J Hematol,** v. 91, n. 2, p. 174-9, 2010.

[4] VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood,** v. 114, n. 5, p. 937-51, 2009.

[5] QUINTÁS-CARDAMA, A. et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. **Nat Rev Drug Discov,** v. 10, n. 2, p. 127-40, 2011.

[6] MEYER, S. C.; LEVINE, R. L. Molecular Pathways: Molecular Basis for Sensitivity and Resistance to JAK Kinase Inhibitors. **Clin Cancer Res,** v. 20, n. 8, p. 2051-9, 2014.

[7] LEVINE, R. L. et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nat Rev Cancer,** v. 7, n. 9, p. 673-83, 2007.

[8] BABON, J. J. et al. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. **Biochem J,** v. 462, n. 1, p. 1-13, 2014.

[9] VAINCHENKER, W.; CONSTANTINESCU, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. **Oncogene,** v. 32, n. 21, p. 2601-13, 2013.

[10] GAUTIER, E. F. et al. The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2V617F oncogene. **Blood,** v. 119, n. 5, p. 1190-9, 2012.

[11] JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature,** v. 434, n. 7037, p. 1144-8, 2005.

[12] HAAN, S. et al. SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. **Oncogene,** v. 28, n. 34, p. 3069-80, 2009.

[13] TONG, W.; ZHANG, J.; LODISH, H. F. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. **Blood,** v. 105, n. 12, p. 4604-12, 2005.

[14] LIU, F. et al. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. **Cancer Cell,** v. 19, n. 2, p. 283-94, 2011.

[15] DAWSON, M. A. et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. **Nature,** v. 461, n. 7265, p. 819-22, 2009.

[16] CAMPBELL, P. J.; GREEN, A. R. The myeloproliferative disorders. **N Engl J Med,** v. 355, n. 23, p. 2452-66, 2006.

[17] BAXTER, E. J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet,** v. 365, n. 9464, p. 1054-61, 2005.

[18] LEVINE, R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell,** v. 7, n. 4, p. 387-97, 2005.

[19] KRALOVICS, R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med,** v. 352, n. 17, p. 1779-90, 2005.

[20] STEIN, B. L.; MOLITERNO, A. R. Primary myelofibrosis and the myeloproliferative neoplasms: the role of individual variation. **JAMA,** v. 303, n. 24, p. 2513-8, 2010.

[21] TEFFERI, A.; VAINCHENKER, W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. **J Clin Oncol,** v. 29, n. 5, p. 573-82, 2011.

[22] PASSAMONTI, F.; RUMI, E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. **Haematologica,** v. 94, n. 1, p. 7-10, 2009.

[23] ALSHEMMARI, S. H. et al. JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms. **Ann Hematol,** v. 93, n. 5, p. 791-6, 2014.

[24] BAROSI, G. et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. **Blood,** v. 110, n. 12, p. 4030-6, 2007.

[25] VANNUCCHI, A. M. et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. **Blood,** v. 110, n. 3, p. 840-6, 2007.

[26] _____. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. **Leukemia,** v. 21, n. 9, p. 1952-9, 2007.

[27] PEMMARAJU, N. et al. The quantitative JAK2 V617F neutrophil allele burden does not correlate with thrombotic risk in essential thrombocytosis. **Leukemia,** v. 21, n. 10, p. 2210-2, 2007.

[28] SCOTT, L. M. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. **N Engl J Med,** v. 356, n. 5, p. 459-68, 2007.

[29] PIKMAN, Y. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLoS Med,** v. 3, n. 7, p. e270, 2006.

[30] TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol,** v. 88, n. 2, p. 141-50, 2013.

[31] KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med,** v. 369, n. 25, p. 2379-90, 2013.

[32] NANGALIA, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. **N Engl J Med,** v. 369, n. 25, p. 2391-405, 2013.

[33] VANNUCCHI, A. M. Management of myelofibrosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program,** v. 2011, p. 222-30, 2011.

[34] TEFFERI, A.; GILLILAND, G. Classification of chronic myeloid disorders: from Dameshek towards a semi-molecular system. **Best Pract Res Clin Haematol,** v. 19, n. 3, p. 365-85, 2006.

[35] PASSAMONTI, F. et al. Myeloproliferative neoplasms: from JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. **Oncotarget,** v. 2, n. 6, p. 485-90, 2011.

[36] MESA, R. A. et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. **Am J Hematol,** v. 61, n. 1, p. 10-5, 1999.

[37] MARTYRÉ, M. C. et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol,** v. 88, n. 1, p. 9-16, 1994.

[38] _____. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol,** v. 97, n. 2, p. 441-8,1997.

[39] CASTRO-MALASPINA, H. et al. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. **Blood,** v. 57, n. 4, p. 781-7, 1981.

[40] ZAULI, G. et al. Reduced responsiveness of bone marrow megakaryocyte progenitors to platelet-derived transforming growth factor beta 1, produced in normal amount, in patients with essential thrombocythaemia. **Br J Haematol,** v. 83, n. 1, p. 14-20, 1993.

[41] THIELE, J. et al. Relevance of bone marrow features in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and early stage idiopathic myelofibrosis. **Haematologica,** v. 85, n. 11, p. 1126-34, 2000.

[42] LE BOUSSE-KERDILÈS, M. C.; MARTYRÉ, M. C. Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Ann Hematol,** v. 78, n. 10, p. 437-44, 1999.

[43] _____. Myelofibrosis: pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. French INSERM Research Network on Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. **Springer Semin Immunopathol,** v. 21, n. 4, p. 491-508, 1999.

[44] LE BOUSSE-KERDILÈS, M. C.; MARTYRÉ, M. C.; MYELOFIBROSIS, F. I. R. N. O. I. Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. **Pathol Biol (Paris),** v. 49, n. 2, p. 153-7, 2001.

[45] DI RAIMONDO, F. et al. Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. **Leukemia,** v. 15, n. 6, p. 976-80, 2001.

[46] STEURER, M. et al. Increased angiogenesis in chronic idiopathic myelofibrosis: vascular endothelial growth factor as a prominent angiogenic factor. **Hum Pathol,** v. 38, n. 7, p. 1057-64, 2007.

[47] LATAILLADE, J. J. et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. **Blood,** v. 112, n. 8, p. 3026-35, 2008.

[48] VERSTOVSEK, S. et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. **N Engl J Med,** v. 363, n. 12, p. 1117-27, 2010.

[49] MUGHAL, T. I. et al. Myelofibrosis-associated complications: pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. **Int J Gen Med,** v. 7, p. 89-101, 2014.

[50] TEFFERI, A. et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. **Blood,** v. 110, n. 4, p. 1092-7, 2007.

[51] BAROSI, G. et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. **Leukemia,** v. 22, n. 2, p. 437-8, 2008.

[52] THIELE, J. et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. **Haematologica,** v. 90, n. 8, p. 1128-32, 2005.

[53] MANOHARAN, A.; HORSLEY, R.; PITNEY, W. R. The reticulin content of bone marrow in acute leukaemia in adults. **Br J Haematol,** v. 43, n. 2, p. 185-90, 1979.

[54] TEFFERI, A. How I treat myelofibrosis. **Blood,** v. 117, n. 13, p. 3494-504, 2011.

[55] MCLORNAN, D. P. et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myelofibrosis in 2012. **Br J Haematol**, 2012.

[56] ROSENTHAL, A.; MESA, R. A. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms. **Expert Opin Pharmacother,** v. 15, n. 9, p. 1265-76, 2014.

[57] VERSTOVSEK, S. et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. **N Engl J Med,** v. 366, n. 9, p. 799-807, 2012.

[58] HARRISON, C. et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. **N Engl J Med,** v. 366, n. 9, p. 787-98, 2012.

[59] PARDANANI, A. et al. **Update On The Long-Term Efficacy and Safety Of Momelotinib, a JAK1 and JAK2 Inhibitor, For The Treatment Of Myelofibrosis**. Blood. 122 2013.

[60] KOMROKJI, R. S. et al. Results of a phase 2 study of pacritinib (SB1518), a JAK2/JAK2(V617F) inhibitor, in patients with myelofibrosis. **Blood,** v. 125, n. 17, p. 2649-55, 2015.

[61] MESA, R. A.; SCHERBER, R. M.; GEYER, H. L. Reducing symptom burden in patients with myeloproliferative neoplasms in the era of JAK inhibitors. **Leuk Lymphoma**, p. 1-39, 2015.

[62] WEIGERT, O. et al. Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. **J Exp Med,** v. 209, n. 2, p. 259-73, 2012.

[63] DESHPANDE, A. et al. Kinase domain mutations confer resistance to novel inhibitors targeting JAK2V617F in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia,** v. 26, n. 4, p. 708-15, 2012.

[64] KOPPIKAR, P. et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. **Nature,** v. 489, n. 7414, p. 155-9, 2012.

[65] WANG, Y. et al. Cotreatment with panobinostat and JAK2 inhibitor TG101209 attenuates JAK2V617F levels and signaling and exerts synergistic cytotoxic effects against human myeloproliferative neoplastic cells. **Blood,** v. 114, n. 24, p. 5024-33, 2009.

[66] SHI, J. G. et al. The effect of CYP3A4 inhibition or induction on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of orally administered ruxolitinib (INCB018424 phosphate) in healthy volunteers. **J Clin Pharmacol,** v. 52, n. 6, p. 809-18, 2012.

[67] DURMUS, S. et al. P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) restrict brain accumulation of the JAK1/2 inhibitor, CYT387. **Pharmacol Res,** v. 76, p. 9-16, 2013.

[68] SISSUNG, T. M. et al. Pharmacogenetics of membrane transporters: an update on current approaches. **Mol Biotechnol,** v. 44, n. 2, p. 152-67, 2010.

[69] MINUESA, G. et al. Drug uptake transporters in antiretroviral therapy. **Pharmacol Ther,** v. 132, n. 3, p. 268-79, 2011.

[70] SIDDIQUI, A. et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. **N Engl J Med,** v. 348, n. 15, p. 1442-8, 2003.

[71] HUANG, Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. **Cancer Metastasis Rev,** v. 26, n. 1, p. 183-201, 2007.

[72] GILLET, J. P.; GOTTESMAN, M. M. Advances in the molecular detection of ABC transporters involved in multidrug resistance in cancer. **Curr Pharm Biotechnol,** v. 12, n. 4, p. 686-92, 2011.

[73] EECHOUTE, K. et al. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. **Clin Cancer Res,** v. 17, n. 3, p. 406-15, 2011.

[74] VIVONA, D. et al. ABCB1 haplotype is associated with major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with standard-dose of imatinib. **Blood Cells Mol Dis,** v. 48, n. 2, p. 132-6, 2012.

[75] SZAKÁCS, G. et al. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). **Drug Discov Today,** v. 13, n. 9-10, p. 379-93, 2008.

[76] SEEGER, M. A.; VAN VEEN, H. W. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. **Biochim Biophys Acta,** v. 1794, n. 5, p. 725-37, 2009.

[77] ROTH, M.; OBAIDAT, A.; HAGENBUCH, B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. **Br J Pharmacol,** v. 165, n. 5, p. 1260-87, 2012.

[78] SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Adv Drug Deliv Rev,** v. 55, n. 1, p. 3-29, 2003.

[79] SHAROM, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. **Essays Biochem,** v. 50, n. 1, p. 161-78, 2011.

[80] THOMAS, H.; COLEY, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. **Cancer Control,** v. 10, n. 2, p. 159-65, 2003.

[81] PAUWELS, E. K. et al. Multidrug resistance in cancer: its mechanism and its modulation. **Drug News Perspect,** v. 20, n. 6, p. 371-7, 2007.

[82] PALMEIRA, A. et al. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. **Curr Med Chem,** v. 19, n. 13, p. 1946-2025, 2012.

[83] THIEBAUT, F. et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 84, n. 21, p. 7735-8, 1987.

[84] SCHINKEL, A. H. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. **Adv Drug Deliv Rev,** v. 36, n. 2-3, p. 179-194, 1999.

[85] LEIGHTON, J. C.; GOLDSTEIN, L. J. P-glycoprotein in adult solid tumors. Expression and prognostic significance. **Hematol Oncol Clin North Am,** v. 9, n. 2, p. 251-73, 1995.

[86] PÉREZ-SAYÁNS, M. et al. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases. **Cancer Lett,** v. 295, n. 2, p. 135-43, 2010.

[87] MARIE, J. P. P-glycoprotein in adult hematologic malignancies. **Hematol Oncol Clin North Am,** v. 9, n. 2, p. 239-49, 1995.

[88] VERRELLE, P. et al. Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst,** v. 83, n. 2, p. 111-6, 1991.

[89] ZHOU, S. F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. **Xenobiotica,** v. 38, n. 7-8, p. 802-32, 2008.

[90] VARMA, M. V. et al. Targeting intestinal transporters for optimizing oral drug absorption. **Curr Drug Metab,** v. 11, n. 9, p. 730-42, 2010.

[91] FRANKE, R. M.; GARDNER, E. R.; SPARREBOOM, A. Pharmacogenetics of drug transporters. **Curr Pharm Des,** v. 16, n. 2, p. 220-30, 2010.

[92] CHEN, C. J. et al. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. **J Biol Chem,** v. 265, n. 1, p. 506-14, 1990.

[93] YIANNAKOPOULOU, E. C. H. Pharmacogenomics of phase II metabolizing enzymes and drug transporters: clinical implications. **Pharmacogenomics J,** v. 13, n. 2, p. 105-9, 2013.

[94] KANTHARIDIS, P. et al. Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts. **Drug Resist Updat,** v. 3, n. 2, p. 99-108, 2000.

[95] IEIRI, I. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). **Drug Metab Pharmacokinet,** v. 27, n. 1, p. 85-105, 2012.

[96] HOFFMEYER, S. et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 97, n. 7, p. 3473-8, 2000.

[97] HARTZ, A. M.; MILLER, D. S.; BAUER, B. Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. **Mol Pharmacol,** v. 77, n. 5, p. 715-23, 2010.

[98] NAWA, A.; FUJITA-HAMABE, W.; TOKUYAMA, S. Altered intestinal P-glycoprotein expression levels in a monosodium glutamate-induced obese mouse model. **Life Sci,** v. 89, n. 23-24, p. 834-8, 2011.

[99] KOBORI, T. et al. Functional alterations of intestinal P-glycoprotein under diabetic conditions. **Biol Pharm Bull,** v. 36, n. 9, p. 1381-90, 2013.

[100]_____. Mechanisms of P-glycoprotein alteration during anticancer treatment: role in the pharmacokinetic and pharmacological effects of various substrate drugs. **J Pharmacol Sci,** v. 125, n. 3, p. 242-54, 2014.

[101]DEFERME, S.; AUGUSTIJNS, P. The effect of food components on the absorption of P-gp substrates: a review. **J Pharm Pharmacol,** v. 55, n. 2, p. 153-62, 2003.

[102]SCHÖNDORF, T. et al. Induction of MDR1-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines. **Anticancer Res,** v. 22, n. 4, p. 2199-203, 2002.

[103]GEKELER, V. et al. Expression of a P-glycoprotein gene is inducible in a multidrug-resistant human leukemia cell line. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 155, n. 2, p. 754-60, 1988.

[104]ABOLHODA, A. et al. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. **Clin Cancer Res,** v. 5, n. 11, p. 3352-6, 1999.

[105]CHAUDHARY, P. M.; RONINSON, I. B. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. **J Natl Cancer Inst,** v. 85, n. 8, p. 632-9, 1993.

[106]HARMSEN, S. et al. PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors. **Eur J Pharm Sci,** v. 48, n. 4-5, p. 644-9, 2013.

[107]BURGER, H. et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. **Cancer Biol Ther,** v. 4, n. 7, p. 747-52, 2005.

[108]DARBY, R. A.; CALLAGHAN, R.; MCMAHON, R. M. P-glycoprotein inhibition: the past, the present and the future. **Curr Drug Metab,** v. 12, n. 8, p. 722-31, 2011.

[109]ABDALLAH, H. M. et al. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. **J Adv Res,** v. 6, n. 1, p. 45-62, 2015.

[110]VIVONA, D. et al. ABCB1 haplotypes are associated with P-gp activity and affect a major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with a standard dose of imatinib. **Oncol Lett,** v. 7, n. 4, p. 1313-1319, 2014.

[111]LEITH, C. P. et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. **Blood,** v. 89, n. 9, p. 3323-9, 1997.

[112]DOYLE, L. A. et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 95, n. 26, p. 15665-70, 1998.

[113]MATSUO, H. et al. Identification of ABCG2 dysfunction as a major factor contributing to gout. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids,** v. 30, n. 12, p. 1098-104, 2011.

[114]TIWARI, A. K. et al. Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **Curr Pharm Biotechnol,** v. 12, n. 4, p. 570-94, 2011.

[115]EJENDAL, K. F.; HRYCYNA, C. A. Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. **Curr Protein Pept Sci,** v. 3, n. 5, p. 503-11, 2002.

[116]TIWARI, A. K. et al. Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. **Biochem Pharmacol,** v. 78, n. 2, p. 153-61, 2009.

[117]ROCCHI, E. et al. The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 271, n. 1, p. 42-6, 2000.

[118]MALIEPAARD, M. et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. **Cancer Res,** v. 61, n. 8, p. 3458-64, 2001.

[119]COORAY, H. C. et al. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. **Neuroreport,** v. 13, n. 16, p. 2059-63, 2002.

[120]WANG, H. et al. Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. **Mol Pharmacol,** v. 73, n. 3, p. 845-54, 2008.

[121]WU, X. et al. Progesterone negatively regulates BCRP in progesterone receptor-positive human breast cancer cells. **Cell Physiol Biochem,** v. 32, n. 2, p. 344-54, 2013.

[122]EE, P. L. et al. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. **Cancer Res,** v. 64, n. 4, p. 1247-51, 2004.

[123]KALALINIA, F. et al. Celecoxib Up Regulates the Expression of Drug Efflux Transporter ABCG2 in Breast Cancer Cell Lines. **Iran J Pharm Res,** v. 13, n. 4, p. 1393-401, 2014.

[124]KIM, Y. K. et al. OCT-1, ABCB1, and ABCG2 Expression in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Treated with Dasatinib or Nilotinib. **Chonnam Med J,** v. 50, n. 3, p. 102-11, 2014.

[125]RODRIGUES, A. C. et al. The expression of efflux and uptake transporters are regulated by statins in Caco-2 and HepG2 cells. **Acta Pharmacol Sin,** v. 30, n. 7, p. 956-64, 2009.

[126]HONORAT, M. et al. Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 375, n. 3, p. 308-14, 2008.

[127]ROBEY, R. W. et al. ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy. **Cancer Biol Ther,** v. 4, n. 2, p. 187-94, 2005.

[128]MA, J. et al. Reduced cellular accumulation of topotecan: a novel mechanism of resistance in a human ovarian cancer cell line. **Br J Cancer,** v. 77, n. 10, p. 1645-52, 1998.

[129]GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. **Nat Rev Drug Discov,** v. 9, n. 3, p. 215-36, 2010.

[130]ELKIND, N. B. et al. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). **Cancer Res,** v. 65, n. 5, p. 1770-7, 2005.

[131]STEINBACH, D. et al. BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. **Leukemia,** v. 16, n. 8, p. 1443-7, 2002.

[132]BENDERRA, Z. et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. **Clin Cancer Res,** v. 10, n. 23, p. 7896-902, 2004.

[133]_____. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. **Clin Cancer Res,** v. 11, n. 21, p. 7764-72, 2005.

[134]UGGLA, B. et al. BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients. **Leuk Res,** v. 29, n. 2, p. 141-6, 2005.

[135]DE LIMA, L. T. et al. Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. **Med Oncol,** v. 31, n. 3, p. 851, 2014.

[136]KOEHLER, M. R. et al. The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. **Cytogenet Cell Genet,** v. 79, n. 3-4, p. 198-200, 1997.

[137]GRÜNDEMANN, D.; SCHÖMIG, E. Gene structures of the human non-neuronal monoamine transporters EMT and OCT2. **Hum Genet,** v. 106, n. 6, p. 627-35, 2000.

[138]HAYER, M.; BÖNISCH, H.; BRÜSS, M. Molecular cloning, functional characterization and genomic organization of four alternatively spliced isoforms of the human organic cation transporter 1 (hOCT1/SLC22A1). **Ann Hum Genet,** v. 63, n. Pt 6, p. 473-82, 1999.

[139]GORBOULEV, V. et al. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. **DNA Cell Biol,** v. 16, n. 7, p. 871-81, 1997.

[140]ZHANG, L. et al. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. **Mol Pharmacol,** v. 51, n. 6, p. 913-21, 1997.

[141]KOEPSELL, H.; LIPS, K.; VOLK, C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. **Pharm Res,** v. 24, n. 7, p. 1227-51, 2007.

[142]NIES, A. T. et al. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. **Hepatology,** v. 50, n. 4, p. 1227-40, 2009.

[143]LAUTEM, A. et al. Downregulation of organic cation transporter 1 (SLC22A1) is associated with tumor progression and reduced patient survival in human cholangiocellular carcinoma. **Int J Oncol,** v. 42, n. 4, p. 1297-304, 2013.

[144]LOZANO, E. et al. Role of the plasma membrane transporter of organic cations OCT1 and its genetic variants in modern liver pharmacology. **Biomed Res Int,** v. 2013, p. 692071, 2013.

[145]MARTINEZ-BECERRA, P. et al. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. **Mol Pharm,** v. 9, n. 6, p. 1693-704, 2012.

[146]GUPTA, S. et al. Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 341, n. 1, p. 16-23, 2012.

[147]HEISE, M. et al. Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance. **BMC Cancer,** v. 12, p. 109, 2012.

[148]WHITE, D. L. et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. **Blood,** v. 110, n. 12, p. 4064-72, 2007.

[149]FRANKE, R. M.; SCHERKENBACH, L. A.; SPARREBOOM, A. Pharmacogenetics of the organic anion transporting polypeptide 1A2. **Pharmacogenomics,** v. 10, n. 3, p. 339-44, 2009.

[150]GAO, B. et al. Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 294, n. 1, p. 73-9, 2000.

[151]LEE, W. et al. Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. **J Biol Chem,** v. 280, n. 10, p. 9610-7, 2005.

[152]GLAESER, H. et al. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. **Clin Pharmacol Ther,** v. 81, n. 3, p. 362-70, 2007.

[153]STECKELBROECK, S. et al. Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study. **J Neurochem,** v. 89, n. 2, p. 403-17, 2004.

[154]KULLAK-UBLICK, G. A. et al. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. **Gastroenterology,** v. 109, n. 4, p. 1274-82, 1995.

[155]_____. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS): identification of a carrier protein in human liver and brain. **FEBS Lett,** v. 424, n. 3, p. 173-6, 1998.

[156]BOSSUYT, X.; MÜLLER, M.; MEIER, P. J. Multispecific amphipathic substrate transport by an organic anion transporter of human liver. **J Hepatol,** v. 25, n. 5, p. 733-8, 1996.

[157]FUJIWARA, K. et al. Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. **Endocrinology,** v. 142, n. 5, p. 2005-12, 2001.

[158]KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. **Br J Pharmacol,** v. 158, n. 3, p. 693-705, 2009.

[159]LU, J. et al. Effects of β-blockers and tricyclic antidepressants on the activity of human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2). **J Pharmacol Exp Ther,** v. 352, n. 3, p. 552-8, 2015.

[160]ELORANTA, J. J. et al. The SLCO1A2 gene, encoding human organic anion-transporting polypeptide 1A2, is transactivated by the vitamin D receptor. **Mol Pharmacol,** v. 82, n. 1, p. 37-46, 2012.

[161]YANG, X. H.; LIU, S. Y.; XING, A. Y. Molecular regulation of organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2)by taurocholic acid in Bewo Cells. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),** v. 60, n. 2, p. 22-6, 2014.

[162]CAMPBELL, S. D. et al. Influence of HIV antiretrovirals on methadone N-demethylation and transport. **Biochem Pharmacol,** v. 95, n. 2, p. 115-25, 2015.

[163]STUTE, P. et al. Impact of testosterone on the expression of organic anion transporting polypeptides (OATP-1A2, OATP-2B1, OATP-3A1) in malignant and non-malignant human breast cells in vitro. **Maturitas,** v. 71, n. 4, p. 376-84, 2012.

[164]BAILEY, D. G. et al. Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice. **Clin Pharmacol Ther,** v. 81, n. 4, p. 495-502, 2007.

[165]DRESSER, G. K. et al. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. **Clin Pharmacol Ther,** v. 71, n. 1, p. 11-20, 2002.

[166]YAMAKAWA, Y. et al. Pharmacokinetic impact of SLCO1A2 polymorphisms on imatinib disposition in patients with chronic myeloid leukemia. **Clin Pharmacol Ther,** v. 90, n. 1, p. 157-63, 2011.

[167]VAN DE STEEG, E. et al. Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice. **Clin Cancer Res,** v. 19, n. 4, p. 821-32, 2013.

[168]IUSUF, D. et al. Human OATP1B1, OATP1B3 and OATP1A2 can mediate the in vivo uptake and clearance of docetaxel. **Int J Cancer,** v. 136, n. 1, p. 225-33, 2015.

[169]BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J Pharmacol Toxicol Methods,** v. 44, n. 1, p. 301-12, 2000.

[170]CASTILLO-GARIT, J. A. et al. Estimation of ADME properties in drug discovery: predicting Caco-2 cell permeability using atom-based stochastic and non-stochastic linear indices. **J Pharm Sci,** v. 97, n. 5, p. 1946-76, 2008.

[171]SAMBUY, Y. et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biol Toxicol,** v. 21, n. 1, p. 1-26, 2005.

[172]MAUBON, N. et al. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. **Fundam Clin Pharmacol,** v. 21, n. 6, p. 659-63, 2007.

[173]RIGALLI, J. P. et al. Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells. **Toxicology,** v. 285, n. 1-2, p. 18-24, 2011.

[174]LIBRA, A. et al. Molecular determinants in the transport of a bile acid-derived diagnostic agent in tumoral and nontumoral cell lines of human liver. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 319, n. 2, p. 809-17, 2006.

[175]DIAS, V.; RIBEIRO, V. The expression of the solute carriers NTCP and OCT-1 is regulated by cholesterol in HepG2 cells. **Fundam Clin Pharmacol,** v. 21, n. 4, p. 445-50, 2007.

[176]BERGINC, K.; TRONTELJ, J.; KRISTL, A. The influence of aged garlic extract on the uptake of saquinavir and darunavir into HepG2 cells and rat liver slices. **Drug Metab Pharmacokinet,** v. 25, n. 3, p. 307-13, 2010.

[177]HEXNER, E. O. et al. Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. **Blood,** v. 111, n. 12, p. 5663-71, 2008.

[178]WILL, B. et al. Apoptosis induced by JAK2 inhibition is mediated by Bim and enhanced by the BH3 mimetic ABT-737 in JAK2 mutant human erythroid cells. **Blood,** v. 115, n. 14, p. 2901-9, 2010.

[179]NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods,** v. 139, n. 2, p. 271-9, 1991.

[180]VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol,** v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

[181]TOGNON-RIBEIRO, R. **Alterações da expressão de apoptomirs, de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticos em Mielofibrose e Trombocitemia Essencial**. 2011. 171 (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

[182]HIRAYAMA, C. et al. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. **Pharm Res,** v. 25, n. 4, p. 827-35, 2008.

[183]LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods,** v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

[184]RAMPAL, R. et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. **Blood,** v. 123, n. 22, p. e123-33, 2014.

[185]MOTTINO, A. D.; CATANIA, V. A. Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. **World J Gastroenterol,** v. 14, n. 46, p. 7068-74, 2008.

[186]MÜLLER, M.; JANSEN, P. L. Molecular aspects of hepatobiliary transport. **Am J Physiol,** v. 272, n. 6 Pt 1, p. G1285-303, 1997.

[187]SCHELLENS, J. H. et al. Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. **Eur J Pharm Sci,** v. 12, n. 2, p. 103-10, 2000.

[188]SUVANNASANKHA, A. et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function. **Leukemia,** v. 18, n. 7, p. 1252-7, 2004.

[189]PLASSCHAERT, S. L. et al. The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia. **Clin Cancer Res,** v. 9, n. 14, p. 5171-7, 2003.

[190]SAUERBREY, A. et al. Expression of the BCRP gene (ABCG2/MXR/ABCP) in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol,** v. 118, n. 1, p. 147-50, 2002.

[191]SUVANNASANKHA, A. et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in adult acute lymphoblastic leukaemia: frequent expression and possible correlation with shorter disease-free survival. **Br J Haematol,** v. 127, n. 4, p. 392-8, 2004.

[192]MAO, Q.; UNADKAT, J. D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. **AAPS J,** v. 17, n. 1, p. 65-82, 2015.

[193]MÜLLER, J. et al. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). **Biochem Pharmacol,** v. 70, n. 12, p. 1851-60, 2005.

[194]THOMAS, J. et al. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. **Blood,** v. 104, n. 12, p. 3739-45, 2004.

[195]WANG, L. et al. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. **Clin Pharmacol Ther,** v. 83, n. 2, p. 258-64, 2008.

[196]ZHOU, Y. et al. Genetic polymorphisms and function of the organic anion-transporting polypeptide 1A2 and its clinical relevance in drug disposition. **Pharmacology,** v. 95, n. 3-4, p. 201-8, 2015.

[197]DIAS, V.; RIBEIRO, V. The expression of the solute carriers NTCP and OCT-1 is regulated by cholesterol in HepG2 cells. **Fundam Clin Pharmacol,** v. 21, n. 4, p. 445-50, 2007.

[198]LEE, T. K.; HAMMOND, C. L.; BALLATORI, N. Intracellular glutathione regulates taurocholate transport in HepG2 cells. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 174, n. 3, p. 207-15, 2001.

[199]ZHAN, K. et al. Effect of X-ray irradiation on expression of organic anion transporting polypeptides. **Int J Radiat Biol,** v. 89, n. 10, p. 832-40, 2013.

[200]LIBRA, A. et al. Molecular determinants in the transport of a bile acid-derived diagnostic agent in tumoral and nontumoral cell lines of human liver. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 319, n. 2, p. 809-17, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

ANEXO 2. Ficha do aluno.

ANEXO 3. Currículo Lattes do aluno.

ANEXO 1. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/ Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

ANEXO 2. Ficha do aluno.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6462852/1 - Guilherme Wataru Gomes

Email:	guilherme.wataru.gomes@usp.br
Data de Nascimento:	19/07/1988
Cédula de Identidade:	RG - 43.765.129-0 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	20/09/2013
Início da Contagem de Prazo:	20/09/2013
Data Limite para o Depósito:	21/03/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara - 20/09/2013 até o presente. Email: emguerra@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 20/09/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 27/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 20/09/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 13/07/2015

Impresso em: 30/09/2015 10:51:15

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6462852/1 - Guilherme Wataru Gomes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
FBC5708-5/2	Farmacogenômica Cardiovascular	30/09/2013	10/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5753-1/1	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	29/10/2013	04/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5734-2/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	09/12/2013	15/12/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5793-12/1	Tópicos em Análises Clínicas I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5757-6/1	Tópicos em Análises Clínicas II	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5709-5/2	Biologia Molecular em Análises Clínicas	22/09/2014	27/10/2014	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5755-2/2	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	30/03/2015	03/05/2015	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBA5897-2/2	Nutrigenômica do Câncer	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 13/07/2015
Impresso em: 30/09/2015 10:51:15

ANEXO 3. Currículo Lattes do aluno.

Guilherme Wataru Gomes

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/2129002926188013
Última atualização do currículo em 30/09/2015

Possui graduação em Farmácia-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Atualmente é aluno de mestrado em Farmácia (Análises Clínicas) pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da mesma instituição. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Guilherme Wataru Gomes
Nome em citações bibliográficas	GOMES, G. W.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 17 Cidade Universitária 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913785

Formação acadêmica/titulação

2013	Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em linhagens celulares tratadas com inibidor comercial da via JAK-STAT,Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
2008 - 2013	Graduação em Farmácia-Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Tratamento da mielofibrose na era dos inibidores da via JAK-STAT: uma revisão da literatura. Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara.

Formação Complementar

2011 - 2011	El Componente Genético de Enfermedades Complejas. (Carga horária: 3h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Atenção Farmacêutica. (Carga horária: 20h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Fundamentos Teóricos em Biologia Molecular Humana. (Carga horária: 20h). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
2011 - 2011	Manuseio, Descarte e Transporte de Resíduo Químico. (Carga horária: 3h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
2010 - 2010	Farmacogenética. (Carga horária: 4h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2010 - 2010	Leucemias: Fisiopatologia e Diagnóstico. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2010 - 2010	Oficina de Desenvolvimento de Perfumes. (Carga horária: 2h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - Atual	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2012 - 2013	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário de Iniciação Científica, Carga horária: 20
Outras informações	Bolsista FAPESP no período 06/2012 a 12/2012

Vínculo institucional

2011 - 2011	Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário de Iniciação Científica, Carga horária: 20

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica/Especialidade: Hematologia.
2.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. LIMA, L. T. ; NUNES, D. P. T. ; **GOMES, G. W.** ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CASTRO, F. A. ; CLIQUET, M. ; SANTOS, M. T. ; MITNE-NETO, M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Serum levels of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors are elevated in JAK2V617F mutated compared to CALR mutated myelofibrosis and triple negative essential thrombocytemia patients. In: 20th Congress of the European Hematology Association, 2015, Viena. Haematologica Abstract Book. Pavia: Ferrata Storti Foundation, 2015. v. 100. p. 523-523.

2. **GOMES, G. W.** ; CASTRO, F. A. ; NUNES, D. P. T. ; LIMA, L. T. ; RODRIGUES, A. C. ; TOGNON-RIBEIRO, R. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . ABCB1 and SLC22A1 mRNA expressions are increased in a homozygous JAK2V617F cell line treated with JAK inhibitor. In: 20th Congress of the European Hematology Association, 2015, Viena. Haematologica Abstract Book. Pavia: Ferrata Storti Foundation, 2015. v. 100. p. 749-749.

3. NUNES, D. P. T. ; LIMA, L. T. ; **GOMES, G. W.** ; YASSUI, C. G. ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CASTRO, F. A. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . TGF-B signaling pathway molecular regulation by SMADs in myelofibrosis patients. In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão. Haematologica - Abstract Book. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v. 99. p. 660-661.

4. **GOMES, G. W.** ; LIMA, L. T. ; NUNES, D. P. T. ; RODRIGUES, A. C. ; CASTRO, F. A. ; TOGNON-RIBEIRO, R. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . JAK-STAT pathway inhibitor do not modulate drug transporters gene expressions in JAK2V617F positive cell line. In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão. Haematologica - Abstract Book. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v. 99. p. 661-662.

LIMA, L. T. ; NUNES, D. P. T. ; **GOMES, G. W.** ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CASTRO, F. A. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Gene expression and protein levels of MMPs, TIMPs and SPARC and their relationship with plasma markers of angiogenesis in myelofibrosis and essential thrombocythemia patients2. In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão. Haematologica - Abstract Book. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v. 99. p. 662-663.

6. NUNES, D. P. T. ; LIMA, L. T. ; **GOMES, G. W.** ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CLIQUET, M. ; SANTOS, M. T. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Elevated mRNA Expression of FGF2 and TGFB1 Genes in Myelofibrosis and Essential Thrombocythemia Patients. In: 56th ASH Annual Meeting and Exposition, 2014, San Francisco. Blood, 2014. v. 124. p. 5179.

7. LIMA, L. T. ; NUNES, D. P. T. ; **GOMES, G. W.** ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CASTRO, F. A. ; SANTOS, M. T. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Higher MMP9 and FGF2 Protein Levels and Elevated MMP9/TIMP Ratios Were Associated with JAK2V617F Mutation Regardless of Allele Burden in Myelofibrosis. In: 56th ASH Annual Meeting and Exposition, 2014, San Francisco. Blood, 2014. v. 124. p. 5192.

8. PANIZ, C. ; LUCENA, M. R. ; BERTINATO, J. F. ; AMORIM, P. M. S. ; **GOMES, G. W.** ; FIGUEIREDO, M. S. ; GREEN, R. ; CANCADO, R. D. ; BONINI-DOMINGOS, C. R. ; BLAIA, V. L. ; CLIQUET, M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Elevated Serum Folic Acid Concentrations Were Associated with Higher mRNA Expression of DHFR Gene in Patients with Hereditary Spherocytosis. In: 56th ASH Annual Meeting and Exposition, 2014, San Francisco. Blood, 2014. v. 124. p. 4005.

9. GUERRA-SHINOHARA, E. M. ; BERTINATO, J. F. ; **GOMES, G. W.** ; BOACNIN, M. R. ; AMORIM FILHO, A. G. ; CARVALHO, M. H. B. ; ZUGAIB, M. . Genetic polymorphisms related to hemostasis and their asssociation with primary recurrent pregnancyloss. In: 18th Congress of the European Hematology Association, 2013, Stockholm. Haematologica - the hematology journal. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2013. v. 98. p. 208-208.

10. BERTINATO, J. F. ; MORELLI, V. M. ; **GOMES, G. W.** ; AMORIM FILHO, A. G. ; CARVALHO, M. H. B. ; ZUGAIB, M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Polymorphisms In Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 In Women With Primary Recurrent Pregnancy Loss. In: 55th ASH Annual Meeting and Exposition, 2013, New Orleans. Blood. Washington, DC, 2013. v. 122. p. 4795-4795.

11. **GOMES, G. W.** ; BERTINATO, J. F. ; MONTEIRO, N. S. ; CARVALHO, M. H. B. ; FRANCISCO, R. P. V. ; ZUGAIB, M. ; MORELLI, V. M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Effect of acquired and inherent factors associated with thrombosis in women with recurrent pregnancy loss. In: XVII Science and Pharmaceutical Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo, 2012, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. v. 48. p. 81-81.

12. BERTINATO, J. F. ; MONTEIRO, N. S. ; **GOMES, G. W.** ; BOACNIN, M. R. ; FRANCISCO, R. P. V. ; AMORIM FILHO, A. G. ; ZUGAIB, M. ; MORELLI, V. M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Interaction between variants of fibrinogen beta chain gene polymorphism and positive antinuclear antibodies on the risk of having recurrent pregnancy loss (RPL). In: 4th Annual Research Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2012, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. v. 48. p. 3-3.

13. GUERRA-SHINOHARA, E. M. ; LAZARO, R. J. ; GIUSTI, K. C. S. ; BRITTO, J. C. ; CAVALCANTE, S. H. ; BOACNIN, M. R. ; **GOMES, G. W.** ; CARVALHO, M. H. B. ; AMORIM FILHO, A. G. ; ZUGAIB, M. ; D'ALMEIDA, V. . Variant of TC2 c. 776c>g polymorphism is associated with elevated risk of recurrent pregnancy loss. In: 8th Internacional Conference on Homocysteine Metabolism, 2011, Lisboa. 8th Internacional Conference on Homocysteine Metabolism - Abstract Book, 2011. p. P27.

14. GUERRA-SHINOHARA, E. M. ; SEINO, F. M. ; BUENO, C. T. ; BRITTO, J. C. ; **GOMES, G. W.** ; GIUSTI, K. C. S. ; BERTINATO, J. F. ; CARVALHO, M. H. B. ; AMORIM FILHO, A. G. ; D'ALMEIDA, V. ; ZUGAIB, M. . Effect of polymorphisms in key enzymes of homocysteine metabolism and their association with recurrent pregnancy loss. In: 8th Internacional Conference on Homocysteine Metabolism, 2011, Lisboa. 8th Internacional Conference on Homocysteine Metabolism - Abstract Book, 2011. p. P28.

15. **GOMES, G. W.** ; BRITTO, J. C. ; MONTEIRO, N. S. ; SEINO, F. M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Anemia, folate and vitamin B12 deficiences: before and after folic acid and iron fortification of flours. In: XVI Science and Pharmaceutical Technology Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo, 2011, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. v. 47. p. 33-33.

16. **GOMES, G. W.** ; BRITTO, J. C. ; SEINO, F. M. ; MONTEIRO, N. S. ; GIUSTI, K. C. S. ; BERTINATO, J. F. ; LAZARO, R. J. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Comparação entre as frequências de anemia, deficiências de folato e vitamina B12 em estudos pré e pós-fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Rio de Janeiro: Internal Editorial Committee, 2011. v. 33. p. 53-53.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 19th Congress of the European Hematology Association. 2014. (Congresso).

2. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014. (Congresso).

3. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia. Comparação entre as frequências de anemia, deficiências de folato e vitamina B12 em estudos pré e pós-fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro. 2011. (Congresso).

4. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica.Anemia, folate and vitamin B12 deficiences: before and after folic acid and iron fortification of flours. 2011. (Simpósio).

5. XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2010. (Outra).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 30/09/2015 às 11:14:15

Imprimir currículo