

RESUMO

FENERICH, B. A. Investigação da participação das proteínas IRS1 e IRS2 na hematopoese utilizando modelos murinos nocaute. 2023. 112 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2023.

Os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS1/2) são proteínas que atuam na transdução de sinais, regulando processos como crescimento celular, metabolismo energético, sobrevivência e proliferação celular. IRS1/2 encontram-se diferencialmente expressos em neoplasias hematológicas e a inibição farmacológica desses alvos resulta em efeitos antineoplásicos em modelos pré-clínicos. Trabalhos prévios conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa indicam que IRS2 é recrutado durante o processo de diferenciação eritroide, megacariocítica e granulocítica. No entanto, o papel de IRS1 e IRS2 na transdução de sinal dos receptores de fatores de crescimento hematopoéticos e sua participação na hematopoese permanece pouco explorado. O presente estudo teve como objetivo principal, investigar os efeitos do nocaute de *Irs1* e *Irs2* sobre a hematopoese utilizando modelos murinos. Camundongos B6.129S2-*Irs1*^{S57X}/J e B6.129-*Irs2*^{tm1Mfw} foram utilizados em background C57BL/6. Para os camundongos *Irs1*, foram realizadas análises mensais do sangue periférico (SP) por hemograma; avaliação do desenvolvimento fetal nas idades gestacionais E+9,5, E+12,5, E+15,5 e E+18,5; e investigação da hematopoese fetal por citometria de fluxo. Camundongos *Irs2* nocautes foram avaliados quanto aos parâmetros hematológicos do SP por hemograma; constituição das populações hematopoéticas do SP, medula óssea (MO) e baço por citometria de fluxo; e reconstituição hematopoética a curto e longo prazo por transplante de medula óssea (TMO). Adicionalmente foi realizada avaliação da expressão gênica por PCR array. Após 28 cruzamentos de animais *Irs1* heterozigotos (HET), um total de 101 HET, 46 selvagens (WT) e 1 *Irs1* nocaute (KO) foi obtido, com uma média de 4,9 ($\pm 1,6$) nascidos vivos por fêmea. Entre os animais WT e HET não houve diferença no peso, parâmetros hematológicos do SP e frequência de células-tronco hematopoéticas (CTHs) no fígado fetal. Análise do desenvolvimento embrionário indicou que os animais *Irs1* KO se desenvolveram até a idade gestacional E+18,5, no entanto, foram identificados como natimortos ou morreram imediatamente após o parto. Animais *Irs2* KO apresentaram redução de glóbulos vermelhos (GV) e hemoglobina ($p=0,005$ e $p=0,003$, respectivamente). O grupo *Irs2* KO apresentou aumento de células-tronco hematopoéticas de longo prazo (CTH-LP; *Irs2* KO: 0,087 % vs. WT: 0,027% vs. HET: 0,022%; todos $p<0,002$) e células-tronco hematopoéticas de curto prazo (CTH-CP; *Irs2* KO: 0,14 % vs. WT: 0,04% vs. HET: 0,03%; todos $p<0,02$); além de aumento significativo de eritroblastos (Ter119+ [*Irs2* KO:

69,5% vs. WT: 57,1%; $p=0.003$]). A análise da reconstituição da hematopoese, 4 e 8 semanas após o TMO, indicou que o grupo transplantado com células de MO de animais Irs2 KO apresentou uma redução de GV, hematócrito e hemoglobina (todos $p<0,05$). Após 8 semanas do TMO, a contagem de plaquetas também reduziu em animais receptores de camundongo nocaute (Irs2 KO: $288 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. WT: $538 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. HET: $530 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p<0,003$ e $p<0,004$, respectivamente). A avaliação a longo prazo (12 meses pós TMO) indicou que o quimerismo não diferiu entre os grupos, com mediana de 96,1% e 93,6% para os receptores de animais WT e Irs2 KO, respectivamente. A longo prazo, receptores de Irs2 KO exibiram redução de glóbulos brancos (WT: $13,7 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. Irs2 KO: $8,7 \times 10^3/\mu\text{L}$) e plaquetas (WT: $1226 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. Irs2 KO: $266 \times 10^3/\mu\text{L}$); todos $p<0,05$. Não houve diferença na série vermelha entre os grupos (todos $p>0,05$). Camundongos transplantados com células Irs2 KO apresentaram aumento da frequência de CTH-LP (Irs2 KO: 0,4% vs. WT: 0,08%); CTH-CP (Irs2 KO: 0,14 % vs. WT:0,05%); progenitores mieloides (Irs2 KO: 2,80% vs. WT:1,78%) e eritroblastos de maturação intermediária (Irs2 KO: 22,1% vs. WT:15,9%), todos $p<0,05$. A avaliação do perfil de expressão gênica de células hematopoéticas de camundongos Irs2 KO indicou modulação de vias envolvidas na hematopoese, incluindo alteração da via Wnt e de genes que codificam citocinas, fatores de crescimento, hormônios tireoidianos e reguladores da eritropoese e megacariopoese.

Palavras-chave: Hematopoese. Nocaute. IRS1. IRS2. Célula-tronco hematopoética.

ABSTRACT

FENERICH, B. A. Investigation of IRS1 and IRS2 function in hematopoiesis using murine knockout models. 2023. 112 p. Thesis (Doctorate) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2023.

Insulin receptor substrates 1 and 2 (IRS1/2) are proteins that act on signal transduction, regulating processes such as cell growth, energy metabolism, cell survival and proliferation. IRS1/2 are differentially expressed in hematological malignancies and the pharmacological inhibition of these targets results in antineoplastic effects in preclinical models. Previous studies conducted by our research group indicates that IRS2 is recruited during erythroid, megakaryocytic and granulocytic differentiation. However, the role of IRS1 and IRS2 in signal transduction and their participation in hematopoiesis remains poorly explored. The aim of this study was to investigate the effects of *Irs1* and *Irs2* knockout on hematopoiesis using murine models. B6.129S2-*Irs1*^{S57X/J} and B6.129-*Irs2*^{tm1Mfw} mice were used in C57BL/6 background. For *Irs1* mice, hematological parameters of peripheral blood (PB) were evaluated monthly by automated blood count, assessment of fetal development were performed at embryonic days E+9.5, E+12.5, E+15.5 and E+18.5, and investigation of fetal hematopoiesis were performed by flow cytometry. *Irs2* knockout mice were evaluated for PB hematological parameters by blood count; constitution of the hematopoietic populations of PB, bone marrow (BM) and spleen by flow cytometry, and short and long-term hematopoietic reconstitution post bone marrow transplantation (BMT). In addition, evaluation of gene expression was performed using PCR array. After 28 intercrosses events, a total of *Irs1* 101 heterozygotes (HET), 46 wild type (WT) and 1 homozygous mice were obtained, with an average of 4.9 (± 1.6) born alive per female. There was no significant difference in body weight, PB hematological parameters and fetal liver hematopoietic stem cells (HSC) frequency between WT and *Irs1* KO animals (all $p > 0.05$). Analysis of embryonic development indicated that *Irs1* KO animals developed up to the gestational age E+18.5, however, *Irs1* KO mice were identified as stillborn or died immediately after delivery. *Irs2* KO animals showed a reduction in red blood cells (RBC) and hemoglobin ($p=0.005$ and $p=0.003$, respectively). *Irs2* KO group showed an increase in hematopoietic stem cells (HSCs), including LT-HSC (*Irs2* KO: 0.087 % vs. WT: 0.027% vs. HET: 0.022%; all $p < 0.002$) and ST-HSC (*Irs2* KO: 0.14 % vs. WT: 0.04% vs. HET: 0.03%; all $p < 0.02$), in addition to a significant increase in erythroblasts (Ter119 + cells [*Irs2* KO: 69.5% vs. WT: 57.1%; $p=0.003$]). Analysis of hematopoiesis reconstitution, 4 and 8 weeks post BMT, indicated that

the group transplanted with hematopoietic cells from Irs2 KO animals showed a reduction in RBC, hematocrit and hemoglobin (all $p < 0.05$). Platelet count decreased after 8 weeks post-transplantation (Irs2 KO: $288 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. WT: $538 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. HET: $530 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p < 0.003$ and $p < 0.004$, respectively). Long-term evaluation (12 months post BMT) indicated that chimerism did not differ between groups, with a median of 96.1% and 93.6% for WT and Irs2 KO recipients, respectively. Long-term Irs2 KO recipients exhibited reduction in leukocytes (WT: $13.7 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. Irs2 KO: $8.7 \times 10^3/\mu\text{L}$) and platelets (WT: $1226 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. Irs2 KO: $266 \times 10^3/\mu\text{L}$); all $p < 0.05$. There was no difference in RBC, hemoglobin and hematocrit between groups (all $p > 0.05$). Mice transplanted with Irs2 KO cells showed an increase in the frequency of LT-HSC (Irs2 KO: 0.4% vs. WT: 0.08%); ST-HSC (Irs2 KO: 0.14% vs. WT: 0.05%); myeloid progenitors (Irs2 KO: 2.80% vs. WT: 1.78%) and intermediately mature erythroblasts (Irs2 KO: 22.1% vs. WT: 15.9%), all $p < 0.05$. Gene expression profile from Irs2 KO hematopoietic cells indicated modulation of pathways involved in hematopoiesis, including deregulation of Wnt pathway and genes that encode cytokines, growth factors, thyroid hormones and regulators of erythropoiesis and megakaryopoiesis.

Keywords: Hematopoiesis. Knockout. IRS1. IRS2. Hematopoietic stem cell.