

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

**JAQUELINE CRISTINA FERNANDES**

**Investigação do potencial antineoplásico de diferentes classes de inibidores  
da via IGF1R-IRS1/2 em neoplasia mieloproliferativa**

**Ribeirão Preto – SP**

**2021**

**JAQUELINE CRISTINA FERNANDES**

**Investigação do potencial antineoplásico de diferentes classes de inibidores da via  
IGF1R-IRS1/2 em neoplasia mieloproliferativa**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Traina

Co-orientador: Prof. Dr. João Agostinho Machado-Neto

**Ribeirão Preto - SP**

**2021**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

**Universidade de São Paulo**

Fernandes, Jaqueline Cristina

Investigação do potencial antineoplásico de diferentes classes de inibidores da via IGF1R-IRS1/2 em neoplasia mieloproliferativa. 86 p.: il.; 30 cm

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

Programa de Pós Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular. Área de concentração: Diferenciação celular normal e neoplásica.

Versão corrigida

Orientadora: Traina, Fabíola

1. NT157
2. OSI-906
3. Neoplasia mieloproliferativa
4. Vias de sinalização

## **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

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

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Projeto nº 2016/14049-0;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HC FMRP/USP)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-tronco e Terapia Celular (INCTC) – Projeto nº 14/50947-7.
- Centro de Terapia Celular – Centro de pesquisa, inovação e difusão (CEPID/FAPESP) – Projeto nº 2013/08135-2.

Nome: FERNANDES, Jaqueline Cristina

Título: Investigação do potencial antineoplásico de diferentes classes de inibidores da via IGF1R-IRS1/2 em neoplasia mieloproliferativa

*Tese apresentada à Faculdade Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências, Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.*

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof.Dr: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

***Dedicatória***

*Aos meus pais, pelo incentivo constante durante toda minha vida e por toda confiança depositada em mim.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde para realizar este trabalho e por estar comigo em todos os momentos.

À minha família, meu pai Carlos, minha mãe Silvana, minha irmã Nathália, e meu namorado João Paulo, por todo apoio e amor.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Traina, pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço a dedicação e todos os ensinamentos, que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

À meu co-orientador Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. João Agostinho Machado-Neto, pela amizade e todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular, em especial aos Professores Coordenadores e secretárias, pelo apoio acadêmico e serviço burocrático.

À Ana Sílvia Gouvêa, Adriana Oliveira, Amélia Góes, Josiane Schiavinato, Bárbara Santana Lemos, Priscila Scheucher, pela paciência, disposição e ajuda nos experimentos.

Às amigas do laboratório de citogenética, Virgínia Lipoli, Diva Hodniki e Ivana Barizza, pela amizade, disposição e ajuda.

Aos amigos Bruna Fenerich, Natasha Fonseca, Bruno Alves, Raissa Tristão, Juan Coelho e Florencia Tellechea, pela amizade, ensinamentos, conselhos e apoio durante essa importante etapa da minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (FAPESP nº 2016/14049-0).

*“A persistência é o menor caminho do êxito”*

*(Charles Chaplin)*



## RESUMO

FERNANDES, J.C. **Investigação do potencial antineoplásico de diferentes classes de inibidores da via IGF1R-IRS1/2 em neoplasia mieloproliferativa.** 2021, 86f. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A via de sinalização de IGF1R-IRS1/2 é um alvo potencial em neoplasias mieloproliferativas (NMP). O silenciamento do substrato 2 do receptor de insulina (IRS2) reduziu a viabilidade e aumentou a apoptose em células JAK2<sup>V617F</sup>. A haploinsuficiência de Igf1r provou uma reversão notável do fenótipo maligno em um modelo de camundongo *knockin* JAK2<sup>V617F</sup>. NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 são inibidores da via IGF1R-IRS1/2 com efeito antineoplásico em uma variedade de linhagens tumorais, entretanto a melhor estratégia farmacológica para NMP e as consequências moleculares desses inibidores permanece indeterminada. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial antineoplásico de diferentes classes de inibidores da via IGF1R-IRS1/2 em neoplasia mieloproliferativa JAK2<sup>V617F</sup>. Células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> e Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> foram submetidas à inibição farmacológica de IGF1R usando NT157 (0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2  $\mu$ M), OSI-906 (2,5, 5, 10, 20 e 40  $\mu$ M) e NVP-AEW541 (2, 4, 6, 8 e 10  $\mu$ M) e a viabilidade celular (MTT), apoptose (anexina V/PI e caspase 3), proliferação celular (Ki-67) e expressão/ativação proteica (Western blot) foram avaliadas. NT157 e OSI-906 foram testados em modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup> *in vivo* e *ex vivo* e em amostras de pacientes com mielofibrose primária. A análise estatística foi realizada pelo teste *t de Student* ou teste de *Mann-Whitney*. Em células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, NT157 na dose  $\geq 0,4$   $\mu$ M, reduziu significativamente a viabilidade e proliferação celular e induziu apoptose em todos os tempos de tratamento. OSI-906 reduziu a viabilidade de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> a partir da dose de 10  $\mu$ M em 24 e 48 horas; e induziu a apoptose apenas na dose mais alta (40  $\mu$ M). NVP-AEW54 reduziu a viabilidade e aumentou a apoptose a partir da dose de 2  $\mu$ M em todos os tempos de tratamento ( $p < 0,05$ ). Resultados semelhantes foram encontrados na ativação da caspase 3 em células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> por *western blotting*. Em células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>, com a presença de meio condicionado com IL3, todos os três inibidores afetaram o crescimento e induziram apoptose de maneira

semelhante a célula mutada. NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 reduziram a fosforilação/ativação de Irs1/2, Igf1r, Jak2, Stat3, Stat5 e P70s6k em células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>; NT-157 aumentou a fosforilação de Erk1/2 e não modulou Akt1/2/3; NVP-AEW541 não modulou Erk1/2. OSI-906 induziu autofagia a partir da dose de 5uM em células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. NT157 (6,4µM), OSI-906 (≥20 µM) e NVP-AEW54 (≥ 6 µM) *ex vivo* reduziram a viabilidade de células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) ou selvagem da proteína JAK2. NT157 e OSI-906 reduziram a formação de colônia e inibiram a fosforilação de Igf1r e Stat3; NT157 aumentou a fosforilação de Akt1/2/3 e Erk1/2 em células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2. NT157 não modulou os parâmetros hematimétricos e o tamanho do baço do modelo murino de NMP JAK2<sup>V617F</sup> *knockin*. O tratamento com OSI-906 no modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup> resultou em redução dos progenitores hematopoéticos eritroides e aumento dos progenitores mieloides da medula óssea, mas não modulou os parâmetros hematimétricos. OSI-906 reduziu o crescimento tumoral no modelo de camundongo induzido por células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. NT157 e OSI-906 reduziram a formação de colônia em amostras de sangue periférico de pacientes com mielofibrose. Em conclusão, OSI-906, NVP-AEW54 e NT157 apresentam efeitos antineoplásicos semelhantes em modelo de NMP JAK2<sup>V617F</sup>, porém foi observado variação dos efeitos celulares e moleculares de acordo com o inibidor testado. Os resultados dos estudos pré-clínicos com os inibidores testados reforçam a implicação da via IGF1R/IRS na patogênese da NMP JAK2<sup>V617F</sup> ao mesmo tempo que indicam o efeito multialvo das drogas.

Palavras-chave: NT157, OSI-906, neoplasia mieloproliferativa, vias de sinalização

## ABSTRACT

FERNANDES, J.C. **Investigation of the antineoplastic effects of different classes of IGF1R-IRS1/2 inhibitors in myeloproliferative neoplasm.** 2021, 86f. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The IGF1R-IRS1/2 signaling pathway is a potential target in myeloproliferative neoplasms (MPN). Insulin receptor substrate 2 (IRS2) silencing reduced viability and increased apoptosis in JAK2<sup>V617F</sup> cells. The *Igf1r* haploinsufficiency proved a remarkable reversal of the malignant phenotype in a *knockin* murine model of JAK2<sup>V617F</sup>. NT157, OSI-906 and NVP-AEW54 are inhibitors of the IGF1R-IRS1/2 pathway with antineoplastic effect in a variety of tumor cell lines, however the best pharmacological strategy for MPN and the molecular consequences of these inhibitors, remains undetermined. The aim of this work was to investigate the antineoplastic potential of different classes of IGF1R-IRS1/2 pathway inhibitors in JAK2<sup>V617F</sup> myeloproliferative neoplasms. Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> and Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> cells were subjected to pharmacological inhibition of IGF1R using NT157 (0.2, 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2  $\mu$ M), OSI-906 (2.5, 5, 10, 20 and 40  $\mu$ M) and NVP-AEW541 (2, 4, 6, 8 and 10  $\mu$ M) and cell viability (MTT), apoptosis (annexin V/PI and caspase 3), cell proliferation (Ki-67) and protein expression/activation (Western blot) were evaluated. NT157 and OSI-906 were tested in a *knockin* murine model of JAK2<sup>V617F</sup> MPN *in vivo* and *ex vivo* and in samples from patients with primary myelofibrosis. Statistical analysis was performed using Student's t-test or Mann-Whitney test. In Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> cells, NT157 at a dose  $\geq 0.4$   $\mu$ M, significantly reduced cell viability and proliferation and induced apoptosis at all treatment times. OSI-906 reduced the viability of Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> cells from the dose of 10  $\mu$ M in 24 and 48 hours; and induced apoptosis only at the highest dose (40  $\mu$ M). NVP-AEW54 reduced viability and increased apoptosis from the dose of 2  $\mu$ M at all treatment times ( $p < 0.05$ ). Similar results were found in caspase 3 activation in Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> cells by *western blotting*. In Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> cells, with the presence of Wehi-3B conditioned medium, all three inhibitors affected growth and induced apoptosis in ways like the mutated cell. NT157, OSI-906 and NVP-AEW54 reduced phosphorylation/activation of Irs1/2, Igf1r, Jak2, Stat3, Stat5 and P70s6k in Ba/F3 cells

JAK2<sup>V617F</sup>; NT157 increased phosphorylation of Erk1/2 and did not modulate Akt1/2/3; NVP-AEW541 has not modulated Erk1/2. OSI-906 induced autophagy from the dose of 5uM in Ba/F3 cells JAK2<sup>V617F</sup>. NT157 (6.4μM), OSI-906 (≥20 μM) and NVP-AEW54 (≥ 6 μM) *ex vivo* reduced the viability of murine cells expressing the mutated (V617F) or wild form of the JAK2 protein. NT157 and OSI-906 reduced colony formation and inhibited phosphorylation of Igf1r and Stat3; NT157 increased the phosphorylation of Akt1/2/3 and Erk1/2 in murine cells expressing the mutated form (V617F) of the JAK2 protein. NT157 did not modulate the hematimetric parameters or the spleen size of the *knockin* murine model of JAK2<sup>V617F</sup> MPN. Treatment with OSI-906 in the *knockin* murine model of JAK2<sup>V617F</sup> MPN resulted in a reduction in erythroid hematopoietic progenitors and an increase in bone marrow myeloid progenitors but did not modulate hematimetric parameters. OSI-906 reduced tumor growth in the murine model induced by Ba/F3 cells JAK2<sup>V617F</sup>. NT157 and OSI-906 reduced colony formation in peripheral blood samples from patients with myelofibrosis. In conclusion, OSI-906, NVP-AEW54 and NT157 have similar antineoplastic effects in the JAK2<sup>V617F</sup> NMP model, however variation of cellular and molecular effects were observed according to the inhibitor tested. The results of preclinical studies with the tested inhibitors reinforce the implication of the IGF1R/IRS pathway in the pathogenesis of JAK2<sup>V617F</sup> MPN while indicating the multi-target effect of the drugs.

Keywords: NT157, OSI-906, myeloproliferative neoplasia, signaling pathways

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. VIA DE SINALIZAÇÃO JAK2/STAT. ....	17
FIGURA 2. VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA PELAS PROTEÍNAS IRS1/2. ....	21
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DOS INIBIDORES FARMACOLÓGICOS. ESTRUTURA QUÍMICA DE NT157 (A), OSI-906 (B) E NVPAEW-54 (C). ....	24
FIGURA 4. EFEITO DE NT157, OSI-906 E NVP-AEW54 NA VIABILIDADE DE CÉLULAS BA/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	41
FIGURA 5. EFEITO DE NT157, OSI-906 E NVP-AEW54 NA VIABILIDADE DE CÉLULAS BA/F3 JAK2 <sup>WT</sup> .....	43
FIGURA 6. EFEITO DE NT157, OSI-906 E NVP-AEW54 NA APOPTOSE DE CÉLULAS BA/F3 JAK2 <sup>V17F</sup> E BA/F3 JAK2 <sup>WT</sup> .....	45
FIGURA 7. FIGURA 7. <i>DOT PLOT</i> REPRESENTATIVO DE UM EXPERIMENTO DE NT157, OSI-906 E NVP-AEW54 EM CÉLULAS BA/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> E BA/F3 JAK2 <sup>WT</sup> . ....	47
FIGURA 8. <i>WESTERN BLOTTING</i> DE CASPASE 3 EM CÉLULAS BA/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> . ....	47
FIGURA 9. EFEITO DE NT157, OSI-906 E NVP-AEW54 NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS BA/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	48
FIGURA 10. EFEITO DE NT157, OSI-906 E NVP-AEW54 EM VIAS DE SINALIZAÇÃO DE CÉLULAS BA/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	49
FIGURA 11. OSI-906 INDUZ AUTOFAGIA EM CÉLULAS BAF3 JAK2 <sup>V617F</sup> . ....	50
FIGURA 12. INIBIDORES DE IGF1R/IR REDUZIRAM A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CAMUNDONGOS EXPRESSANDO A FORMA MUTADA (V617F) OU SELVAGEM DA PROTEÍNA JAK2 .....	51
FIGURA 13. O TRATAMENTO COM OSI-906 E NT157 <i>IN VITRO</i> REDUZ A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS EXPRESSANDO A FORMA MUTADA (V617F) DA PROTEÍNA JAK2 .....	52
FIGURA 14. O TRATAMENTO COM OSI-906 E NT157 <i>IN VITRO</i> MODULA VIAS DE SINALIZAÇÃO EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS EXPRESSANDO A FORMA MUTADA (V617F) DA PROTEÍNA JAK2. ....	53
FIGURA 15. NT157 EM MODELO MURINO DE NMP JAK2 <sup>V617F</sup> <i>KNOCKIN</i> . ESTUDO EXPERIMENTAL PARA INDUÇÃO DE FENÓTIPO DE NMP EM CAMUNDONGO.. ....	56
FIGURA 16. OSI-906 EM MODELO MURINO DE NMP <i>KNOCKIN</i> PARA JAK2 <sup>V617F</sup> . ESTUDO EXPERIMENTAL PARA INDUÇÃO DE FENÓTIPO DE NMP EM CAMUNDONGO.....	57
FIGURA 17. EFEITO DO TRATAMENTO COM OSI-906 NOS PROGENITORES EM MODELO MURINO DE NMP <i>KNOCKIN</i> PARA JAK2 <sup>V617F</sup> .....	59
FIGURA 18. OSI-906 REDUZ O CRESCIMENTO TUMORAL EM MODELO DE TUMORIGÊNESE INDUZIDO POR CÉLULAS BA/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	60
FIGURA 19. O TRATAMENTO COM OSI-906 E NT157 <i>IN VITRO</i> REDUZ A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM MIELOFIBROSE PRIMÁRIA. ....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. MODELOS EXPERIMENTAIS .....	30
TABELA 2. ANTICORPOS UTILIZADOS PARA <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	33
<b>TABELA 3. IMUNOFENÓTIPO DE CÉLULAS TRONCO E PROGENITORAS HEMATOPOÉTIICAS AVALIADOS.</b>	<b>37</b>
TABELA 4. ANTICORPOS UTILIZADOS PARA A MARCAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E PROGENITORES HEMATOPOÉTIICOS AVALIADOS. .....	38

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Neoplasias mieloproliferativas .....	16
1.2. Mutação JAK2 <sup>V617F</sup> .....	17
1.3. Tratamento das neoplasias mieloproliferativas .....	18
1.4. A via de sinalização IGF1R-IRS1/2 .....	19
1.5. Inibidores farmacológicos da via IGF1R-IRS1/2 .....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
2.1. Objetivos específicos .....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1 Casuística .....	28
3.2. Linhagens celulares .....	28
3.3. Inibidores farmacológicos .....	29
3.4. Animais .....	30
3.5. Ensaio funcionais .....	31
3.5.1. Avaliação da viabilidade celular .....	31
3.5.2. Avaliação de apoptose .....	31
3.5.3. Avaliação da proliferação celular .....	32
3.6. Western Blotting .....	32
3.7. Avaliação do crescimento clonal .....	34
3.8. Avaliação da autofagia .....	34
3.9. Modelo murino de transplante de NMP induzido por células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	34
3.10. Modelo murino com expressão condicionada da mutação JAK2 <sup>V617F</sup> .....	35
3.10.1. Avaliação do efeito do tratamento com os inibidores farmacológicos da via IGF1R/IR (OSI-906) e IGF1R/IRS (NT157) em modelo murino de NMP JAK2 <sup>V617F</sup> knockin <i>in vivo</i> .....	36

3.10.2. Obtenção de células hematopoéticas de modelo murino JAK2 <sup>V617F</sup> .....	36
3.10.3. Análise das populações hematopoéticas murinas por citometria de fluxo .....	37
3.11. Avaliação do efeito do tratamento com os inibidores farmacológicos da via IGF1R/IR (OSI-906) e IGF1R/IRS (NT157) em modelo murino de NMP JAK2 <sup>V617F</sup> knockin ex vivo..	38
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1. Avaliação do efeito dos inibidores farmacológicos de IGF1R-IRS1/2 na viabilidade, apoptose, proliferação e análise de expressão e fosforilação de proteínas nas linhagens celulares Ba/F3 JAK2 <sup>WT</sup> e Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	40
4.1.1. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na viabilidade de células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	40
4.1.2. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na viabilidade de células Ba/F3 JAK2 <sup>WT</sup> .....	42
4.1.3. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na apoptose de células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> e Ba/F3 JAK2 <sup>WT</sup> .....	44
4.1.4. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na proliferação celular de células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	47
4.1.5. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 em vias de sinalização de células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	49
4.1.6. Efeito do OSI-906 na indução da autofagia em em células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	50
4.2. Avaliação ex vivo do efeito dos inibidores farmacológicos de IGF1R-IRS1/2 em células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) ou selvagem da proteína JAK2.....	50
4.2.1. A inibição farmacológica de IGF1R/IR reduz a viabilidade de células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) ou selvagem da proteína JAK2.....	50
4.2.2. A inibição farmacológica de IGF1R/IR reduziu a formação de colônias de células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2.....	52
4.2.3. A inibição farmacológica de IGF1R/IR modulou vias de sinalização em células da medula óssea de camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2 ..	53
4.3. O tratamento com o inibidor NT157, in vivo, não modulou os parâmetros hematimétricos e nem o tamanho do baço do modelo murino de NMP JAK2 <sup>V617F</sup> knockin .....	54
4.4. O tratamento com o inibidor OSI-906, in vivo, reduziu progenitores eritróides e aumentou os progenitores mielóides do modelo murino de NMP JAK2 <sup>V617F</sup> knockin .....	56
4.5. OSI-906 reduz o crescimento tumoral induzido por células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> .....	59



4.6. O tratamento com os inibidores seletivos de IGF1R/IRS (NT157) e IGF1R/IR (OSI-906) reduziu o crescimento clonal de pacientes com mielofibrose primária.....	60
5. <b>DISCUSSÃO</b> .....	63
6. <b>CONCLUSÃO</b> .....	68
7. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70

# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Neoplasias mieloproliferativas

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) compreendem um grupo de doenças caracterizadas por mutações somáticas que ocorrem nas células tronco hematopoéticas e células progenitoras, que levam a expansão clonal e a produção excessiva de células sanguíneas maduras. A hiperplasia de células sanguíneas diferenciadas na NMP é restrita principalmente a linhagem mieloide, incluindo eritrócitos, megacariócitos e granulócitos<sup>1; 2</sup>. Entre as subcategorias das NMP, a leucemia mieloide crônica (LMC) se distingue das outras pela presença da proteína de fusão BCR-ABL1<sup>3</sup>. As NMP BCR-ABL1 negativas mais prevalentes são policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP), que compõem as NMP clássicas<sup>1</sup>.

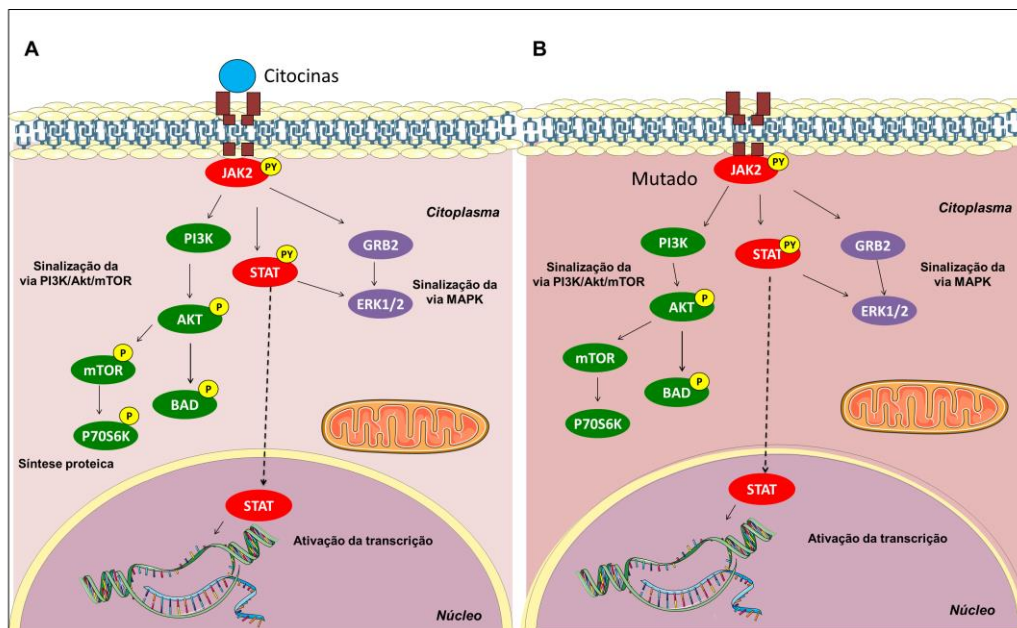
A PV é caracterizada pela produção excessiva de progenitores e células maduras da linhagem eritroide. Pacientes acometidos com PV apresentam redução na sobrevida, aumento do risco de eventos de tromboembolismo e hemorragias, sintomas constitucionais intensos e propensão para evoluir clinicamente para mielofibrose pós PV e LMA<sup>4; 5</sup>. A PV acomete mais mulheres do que homens e é incomum em pacientes com menos de 60 anos<sup>6; 7</sup>. Pacientes com PV tem expectativa de vida de 14 anos após o diagnóstico<sup>8</sup>.

A TE é caracterizada pela trombocitose e presença de hiperplasia megacariocítica<sup>2; 9</sup>. A doença pode apresentar complicações relacionadas ao processo de coagulação, incluindo trombose e sangramentos<sup>10; 11</sup>. Assim como na PV, o gênero feminino é o mais acometido pela TE e a doença é incomum em pacientes com menos de 60 anos<sup>6; 7</sup>. Ainda que a PV e TE afetem linhagens mieloides distintas, é notável que as duas entidades compartilhem características clínicas e moleculares, além de ambas apresentarem um curso natural semelhante, culminando na ocorrência de eventos hemorrágicos, e/ou na progressão para mielofibrose secundária e LMA<sup>12</sup>.

Dentre as NMPs, a MFP é uma doença mais agressiva, tendo como característica principal, presença de fibrose na medula óssea e hiperplasia megacariocítica<sup>2; 11</sup>. A fibrose medular pode levar a uma hematopoese ineficaz e progressiva falência medular<sup>1; 13</sup>. A idade média ao diagnóstico é de 66 anos e a doença ocorre na mesma proporção em ambos os gêneros<sup>14</sup>.

## 1.2. Mutação JAK2<sup>V617F</sup>

A descoberta da mutação recorrente JAK2<sup>V617F</sup> contribuiu para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese das NMP<sup>15</sup>. As proteínas JAK quinases se associam à porção intracelular de receptores de citocinas e fatores de crescimento hematopoéticos, que não possuem atividade tirosinoquinase intrínseca<sup>16</sup>. A interação com esses receptores é responsável pela fosforilação e ativação das JAK quinases, que por sua vez participam da transdução de sinal, ativando importantes vias de sinalização intracelular incluindo STAT, MAPK e PI3K/AKT/mTOR<sup>17; 18; 19</sup>. Mutações no domínio pseudoquinase inativo (JH2) de JAK2 acarretam na perda da propriedade autoinibitória do mesmo, resultando no aumento da atividade quinase do domínio JH1 e ativação de JAK2 de forma independente da presença de citocinas e fatores de crescimento<sup>20</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1. Via de sinalização JAK2/STAT.** A ligação de citocinas e fatores de crescimento hematopoéticos a receptores é responsável pela fosforilação e ativação das JAK quinases, que por sua vez participam da transdução de sinal, ativando importantes vias de sinalização intracelular incluindo STAT, MAPK e PI3K/AKT/Mtor (A); Mutações no domínio pseudoquinase inativo (JH2) de JAK2 acarretam na perda da propriedade autoinibitória do mesmo, resultando no aumento da atividade quinase do domínio JH1 e ativação de JAK2 de forma independente da presença de citocinas e fatores de crescimento (B). A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

A demonstração que a mutação JAK2<sup>V617F</sup> causa fenótipo de NMP em modelo murino, e que esta transformação é dependente de STAT5A/5B comprova a participação da via JAK2/STAT5 como participante da fisiopatologia destas doenças <sup>21</sup>.

Apesar da mutação JAK2<sup>V617F</sup> estar presente em aproximadamente 95% dos pacientes com PV e em 50-60% dos pacientes com TE e MFP <sup>22</sup>, mecanismos alternativos também podem ativar a via JAK2/STAT e estar envolvidos na patogênese das NMP <sup>23; 24; 25</sup>. A mutação recorrente no gene *MPL* (*MPL* W515L, W515K, W515R, W515A), que codifica o receptor da trombopoetina, está presente em aproximadamente 5% dos pacientes com ET e em 10% dos pacientes com MFP negativos para JAK2 V617F <sup>26</sup>. A mutação *MPL* W515L, assim como JAK2<sup>V617F</sup>, é capaz de induzir a ativação de STAT5, com consequente ativação constitutiva de vias de sinalização celular <sup>27</sup>. Mutações somáticas em *CALR* foram detectadas em 67% dos pacientes com ET e 88% dos pacientes com MFP negativos para as mutações JAK2 e *MPL* <sup>28</sup>. As mutações de *CALR* mais frequentes (~80%) são classificadas em tipo-1 (L367fs\*46, deleção de 52pb) e tipo-2 (K385fs\*47, inserção de 5pb) <sup>28; 29</sup>. Ambas as mutações resultam em alterações no sentido de leitura do gene, com consequente substituição da região C-terminal, codificada pelo éxon 9 <sup>28</sup>. Elf e colaboradores descreveram que mutações em *CALR* são suficientes para o surgimento de um fenótipo semelhante a TE *in vivo*, e que a capacidade transformante das mutações em *CALR* é dependente do receptor de trombopoetina <sup>30</sup>. Mutações em reguladores epigenéticos, como TET2, ASXL1, EZH2 e DNMT3A, têm sido recentemente descritas em NMP e podem contribuir na patogênese destas doenças <sup>31</sup>.

### 1.3. Tratamento das neoplasias mieloproliferativas

O tempo de sobrevida dos pacientes com PV e TE é relativamente alto e o risco de transformação leucêmica é baixo, portanto, o objetivo primordial do tratamento nesses pacientes é prevenir trombooses e aliviar os sintomas. As opções de tratamento disponíveis incluem a droga de primeira linha conhecida como hidroxycarbamida (hidroxiuréia) que atua como agente citorredutor pela inativação da síntese de DNA <sup>32</sup>. Entretanto, aproximadamente 24% dos pacientes desenvolvem resistência ou intolerância à hidroxiureia ao longo do tempo e, mais importante ainda, a resistência está associada a um curso mais agressivo da doença em pacientes com PV <sup>33</sup>.

Nos casos de toxicidade à hidroxúreia ou falência terapêutica, opta-se pela administração de interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) ou busulfano. O IFN- $\alpha$  é uma citocina que apresenta atividade antiproliferativa em células tronco hematopoéticas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo capaz de induzir e manter a remissão hematológica completa em pacientes com PV. A toxicidade tem sido uma barreira significativa para o uso do IFN- $\alpha$ , pois aproximadamente 25% - 40% dos pacientes descontinuem a terapia devido aos efeitos adversos <sup>34</sup>.

O busulfano é um agente de alquilação e tem sido usado como tratamento para várias doenças hematológicas malignas. Em pacientes com PV e TE, o busulfano, usado em menor dose, pode resultar em controle hematológico razoável, mas não altera a história natural dessas NMP <sup>35; 36</sup>.

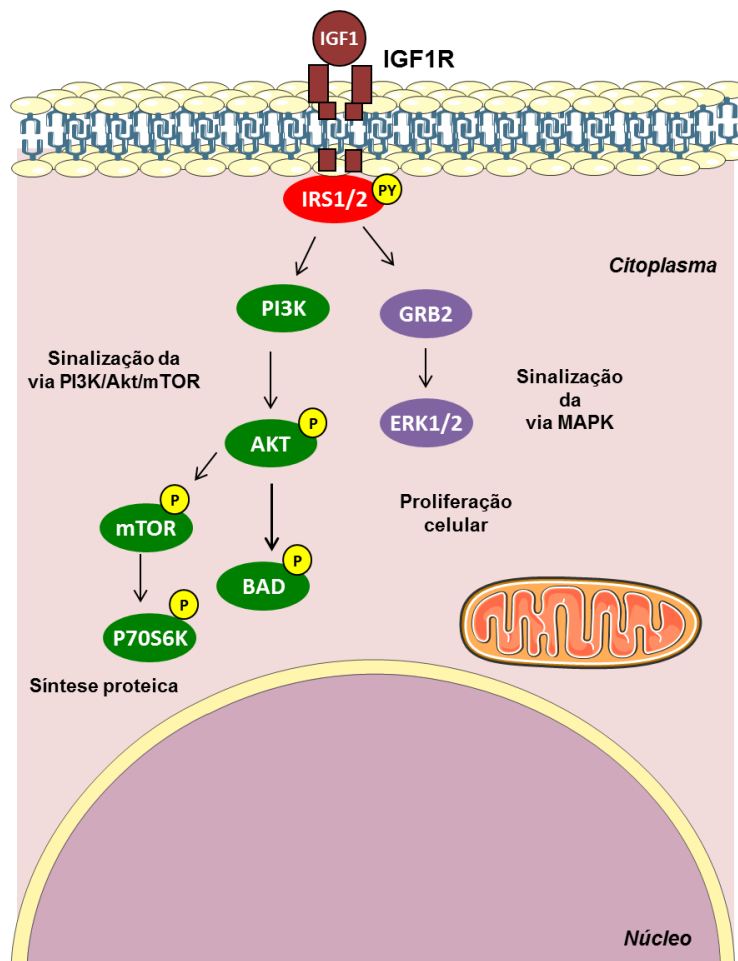
Inibidores seletivos de JAK1/2 foram desenvolvidos e testados clinicamente, sendo o ruxolitinibe, o inibidor aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (novembro de 2015) para uso clínico em pacientes com MFP de risco intermediário ou alto, e o primeiro inibidor oral de JAK1/2 aprovado para o tratamento de pacientes com PV resistentes ou intolerantes à hidroxúreia <sup>37</sup>. Ruxolitinibe age ao competir com a ligação da adenosina trifosfato (ATP) no sítio catalítico da JAK2, inibindo a sua atividade quinase <sup>38</sup>. Esse fármaco é bem tolerado, reduz citocinas inflamatórias e esplenomegalia, além de amenizar sintomas constitucionais, porém não reverte a fibrose na medula óssea <sup>39; 40; 41</sup>. Estudos de fase II e III demonstram sua eficácia no controle dos sintomas e parâmetros da doença, como porcentagem do hematócrito ou tamanho do baço nos pacientes com PV <sup>42</sup>, além disso, ruxolitinibe diminui a esplenomegalia (redução maior que 50% de palpação) em 44% dos pacientes com MF, tanto JAK2<sup>V617F</sup> positivos, quanto negativos <sup>43</sup>. Apesar de haver uma tendência de aumento da sobrevida global nos pacientes tratados, toxicidade hematológica ocorre em mais de 40% dos pacientes <sup>44; 45</sup>, e a inibição farmacológica de JAK2 em modelo murino falhou em eliminar a população de células-tronco iniciadoras das NMP <sup>46</sup>. É provável que outros fatores genéticos ou epigenéticos estejam contribuindo para o fenótipo das NMP, o que reforça a necessidade da busca por mecanismos adicionais e novas abordagens terapêuticas.

#### **1.4. A via de sinalização IGF1R-IRS1/2**

O receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF1R) é uma proteína transmembrana que possui atividade tirosinoquinase intrínseca <sup>47</sup>. IGF1R regula

diferentes processos biológicos, como proliferação, sobrevivência, diferenciação e transformação celular, além de desempenhar um papel no desenvolvimento e manutenção de células-tronco cancerígenas, na transição epitélio-mesenquimal e na regulação do microambiente tumoral <sup>48; 49</sup>. A via de sinalização do IGF1R é iniciada através da ligação do mesmo ao seu ligante, o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF1), seguido da ativação de seus substratos, como os substratos do receptor de insulina (IRS) <sup>50</sup>.

Os substratos do receptor de insulina (*insulin receptor substrate*; IRS) são proteínas citoplasmáticas adaptadoras que estão envolvidas na transdução de sinal de receptores tirosinoquinase, incluindo o receptor de insulina (*insulin receptor*; IR) e o IGF1R <sup>51</sup>. Proteínas IRS regulam uma série de processos, tais como crescimento, metabolismo, sobrevivência e proliferação celular e possuem expressão alterada em alguns tipos de câncer, podendo atuar como oncogenes e induzir transformação maligna <sup>51; 52; 53; 54</sup>. A interação com o IGF1R/IR promove a fosforilação em resíduos de tirosina na região carboxi-terminal dos IRS, o que cria sítios de ligação para proteínas efetoras com domínio SH2, que são capazes de ativar múltiplas vias de sinalização, incluindo PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK <sup>55; 56</sup> (**Figura 2**).



**Figura 2. Via de sinalização mediada pelas proteínas IRS1/2.** As proteínas adaptadoras citoplasmáticas IRS1/2 são recrutadas e ativadas através da fosforilação em tirosina nos domínios PH/PTB. A associação das proteínas IRS com seus receptores que possuem atividade tirosinoquinase (receptor da insulina [IR], receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 [IGF1R]) resulta na fosforilação do IRS1/2 em seus resíduos de tirosina na porção C-terminal. Essa ativação gera sítios de ligação e recrutam proteínas efetoras que participam da sinalização celular das vias JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK (via canônica), regulando diversos processos biológicos, incluindo proliferação celular, síntese proteica, sobrevivência celular e expressão gênica em tecidos específicos. A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

IRS1 foi o primeiro membro das proteínas IRS a ser identificado, estando localizado no cromossomo 2 (2q36.37) com peso molecular de 185 kDa <sup>57</sup>. Além de sua função metabólica e promotora de crescimento, IRS1 também desempenha uma função na transformação maligna, estando frequentemente associado ao crescimento tumoral e proliferação <sup>58; 59; 60; 61</sup>. Estudos demonstraram que quando os níveis de IRS1 são reduzidos por procedimentos experimentais, células cancerosas perdem seu fenótipo transformado <sup>62; 63</sup>. A relevância das proteínas IRS em neoplasias hematológicas foi inicialmente identificada e descrita pelo nosso grupo de pesquisa. Em células K562 BCR-ABL1 positivas, identificamos que IRS1 é capaz de se associar com o BCR-ABL1 e ativar a PI3K e GRB2, com potencial de ativar a via PI3K/AKT/mTOR e a via MAPK <sup>64</sup>. Subsequentemente, demonstramos que o silenciamento de IRS1 em células K562 resultou na diminuição da proliferação celular e clonogenicidade, além da inibição das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK <sup>65</sup>. Nosso grupo de pesquisa também identificou que IRS1 se associa a  $\beta$ -catenina e possivelmente participa da translocação nuclear da mesma e ativação de MYC na linhagem celular de leucemia linfóide aguda, Jurkat <sup>66</sup>.

IRS2 é uma proteína adaptadora de 180 kDa que se liga e medeia sinalização mitogênica e antiapoptótica de IR, IGF1R, EPOR, MPL, VEGF, leptina, GH, interleucinas e IFN $\alpha/\beta/\gamma$ , apresentando um importante papel na resposta aos estímulos de citocinas e de fatores de crescimento em células hematopoéticas, além de influenciar a proliferação de células neoplásicas <sup>67; 68</sup>. Em células não hematológicas, estudos prévios descreveram o envolvimento de IRS2 na via de sinalização de JAK2. Utilizando modelos *in vivo* ou culturas de células musculares lisas de aortas de ratos, foi demonstrado que angiotensina II estimula a rápida fosforilação de resíduos de tirosina de JAK2, aumentando sua atividade catalítica e sua associação e co-immunoprecipitação com IRS1 e IRS2 <sup>69; 70; 71</sup>. A associação entre IRS2 e JAK2 também foi descrita em células de ventrículo esquerdo de rato após estímulo com angiotensina <sup>72; 73</sup> e em fígado de rato após estímulo com leptina <sup>74</sup>.



Nosso grupo de pesquisa encontrou uma associação entre JAK2 e IRS2, na linhagem celular JAK2<sup>V617F</sup> HEL, mas não na linhagem JAK2 selvagem U937. A expressão de *IRS2* foi maior em células CD34<sup>+</sup> de sangue periférico de pacientes portadores da mutação JAK2 V617F em relação aos pacientes JAK2 selvagem. O silenciamento do *IRS2*, em células HEL, foi suficiente para diminuir a fosforilação de STAT5, reduzir a viabilidade celular e aumentar a apoptose nessas células, e apresentou efeito cumulativo com ruxolitinibe <sup>75</sup>. A análise de sequenciamento de segunda geração realizada por Savage e colaboradores identificou mutação em *IRS2* em 5,4% de 56 pacientes com NMP BCR-ABL1 negativos e em 13,6% de 22 pacientes com LMC resistentes ao imatinibe. A expressão de duas formas variantes de *IRS2* em Ba/F3 resultou em aquisição de capacidade de sobrevivência na ausência de IL-3 <sup>76</sup>.

Corroborando com os nossos achados que indicam a relevância da via IGF1R/IRS em NMP, outro grupo de pesquisa descreveu um novo mecanismo que indicou a relevância da participação de IGF1R em NMP e pontuou um efeito benéfico de inibidores farmacológicos de IGF1R nesta doença <sup>77</sup>. Estudando a proteína AIRAPL, codificada pelo gene ZFAND2B, Osorio e colaboradores <sup>77</sup> observaram que camundongos deficientes para *Zfand2b* desenvolveram um fenótipo de NMP. Um aumento da ativação do *Igf1r* foi observado nos camundongos *Zfand2b*<sup>-/-</sup>. A haploinsuficiência de *Igf1r* ou o inibidor tirosinoquinase NVP-AEW54, utilizado como inibidor de IGF1R, preveniu o desenvolvimento de NMP em camundongos deficientes para *Zfand2b*.

Estudos anteriores à descoberta da mutação JAK2 V617F já indicavam uma alta expressão e ativação de IGF1R em amostras de pacientes com PV <sup>78; 79; 80</sup>. Staerk e colaboradores descreveram que a expressão do mutante JAK2 V617F torna as células Ba/F3 hipersensíveis ao IGF1, o qual ativa STAT5, STAT3, Erk1/2 e AKT <sup>81</sup>. Gual e colaboradores encontraram uma associação da via de IGF1R/IR com JAK1 e JAK2 através de estudos realizados em células de fibroblastos, NIH3T3 <sup>82</sup>. Ambos os estudos <sup>81; 82</sup> não testaram o efeito de inibidores farmacológicos desta via nas NMP. É evidente a necessidade de estudos atuais com objetivo de testar novas drogas e permitir que o conhecimento adquirido através de estudos de ciência básica seja aplicado na prática clínica.

### **1.5. Inibidores farmacológicos da via IGF1R-IRS1/2**

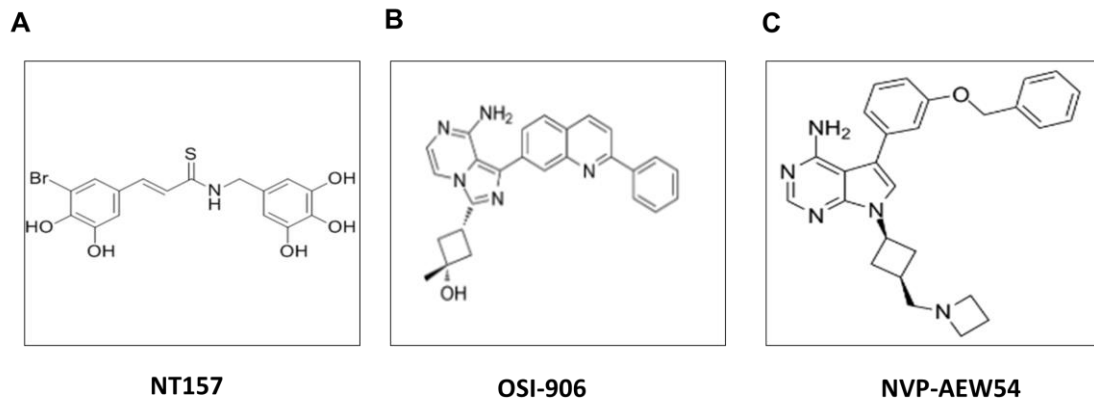
A eficácia antineoplásica do inibidor tirosinoquinase NVP-AEW54 foi demonstrada em modelos experimentais de leucemia mieloide aguda <sup>83</sup>, mieloma múltiplo <sup>84</sup>, câncer de

ovário <sup>85</sup> e de mama <sup>86</sup>. Apesar de Osorio e colaboradores <sup>77</sup> terem demonstrado o benefício do tratamento com NVP-AEW541 em modelos murinos de NMP, Chapius et al <sup>87</sup> observaram anteriormente que NVP-AEW541 é capaz de inibir a sinalização induzida não apenas pelo IGF1, mas também a sinalização induzida por FLT3L e SCF em células de LMA. Sendo assim, a atividade antileucêmica da inibição de IGF1R pode ser melhor investigada utilizando estratégias farmacológicas mais específicas em modelos de NMP. A necessidade de se testar novos inibidores farmacológicos de IGF1R em modelos de NMP também foi indicada por LaFave e Levine <sup>88</sup> que comentaram o trabalho de Osorio e colaboradores <sup>77</sup>.

Linsitinib (OSI-906) é um potente inibidor altamente seletivo para os receptores tirosinoquinase, IGF1R e IR, com efeito antiproliferativo em uma variedade de linhagens celulares de tumores sólidos, e efeito antitumoral em modelo xenográfico <sup>89; 90</sup>. Além disso, estudos clínicos demonstraram a atividade antitumoral de OSI-906 em pacientes com melanoma e carcinoma adrenocortical <sup>91; 92; 93</sup>.

O grupo de pesquisadores de Israel liderado pelo Prof. Alexander Levitzki desenvolveu um composto capaz de inibir IRS1/2, o NT157 <sup>94</sup>. Em modelos de linhagens de neoplasias sólidas, o NT157 induz a fosforilação de IRS1 e IRS2 em serina, resultando na sua degradação, com consequente inibição da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, redução da proliferação celular e aumento da apoptose. O tratamento com NT157, *in vivo*, inibiu significativamente o crescimento de tumores sólidos <sup>94; 95</sup>. A inibição farmacológica de IRS1/2 foi suficiente para inibir a formação de colônias e a migração de células de melanoma, não afetando melanócitos normais <sup>94</sup>. Os mesmos efeitos antiproliferativos da inibição farmacológica de IRS1/2 foram observados em células de câncer de próstata e osteossarcoma <sup>96; 97</sup>.

A inibição farmacológica de IRS1/2 com NT157 reduziu a viabilidade celular em amostras de NMP primárias JAK2<sup>V617F</sup>, mas não em amostras JAK2 selvagens <sup>75</sup>. em células HEL JAK2<sup>V617F</sup>, NT157 reduz viabilidade, clonogenicidade e proliferação celular, induz apoptose, inibe a fosforilação de STAT3 e ERK e modula a expressão de 23 oncogenes e genes supressores tumorais <sup>98</sup>. A estrutura química dos compostos utilizados está indicada na Figura 3.



**Figura 3. Estrutura química dos inibidores farmacológicos.** Estrutura química de NT157 (A), OSI-906 (B) e NVPAEW-54 (C).

# ***OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o potencial antineoplásico de diferentes classes de inibidores da via IGF1R-IRS1/2 em neoplasia mieloproliferativa.

### 2.1. Objetivos específicos

#### **Em linhagens celulares Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> e Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>:**

- Avaliar e comparar a viabilidade, proliferação, apoptose, e a ativação das vias JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK em células tratadas com veículo ou inibidores farmacológicos NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 *in vitro*;

#### **Em modelo murino de NMP *knockin* para a mutação JAK2<sup>V617F</sup>:**

- Avaliar e comparar as subpopulações de progenitores hematopoéticos em animais tratados com veículo ou inibidores farmacológicos da via IGF1R/IR (OSI-906) e IGF1R/IRS (NT157) *in vivo*;
- Avaliar a viabilidade e a ativação das vias JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK em células tratadas com veículo ou inibidores farmacológicos NT157 ou OSI-906 *ex vivo*;

#### **Em modelo murino de transplante de NMP induzido por células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>:**

- Avaliar e comparar o tumor nos animais transplantados submetidos ao tratamento com veículo ou inibidor farmacológico OSI-906 *in vivo*;

#### **Em células primárias de pacientes com mielofibrose:**

- Avaliar a formação de colônias em amostras de pacientes tratados com veículo ou inibidores farmacológicos NT157 ou OSI-906.

# ***MATERIAL E MÉTODOS***

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

As amostras utilizadas foram obtidas de pacientes com diagnóstico de mielofibrose primária sem uso de medicação para a doença de base (#1: mulher, JAK2<sup>V617F</sup> positivo; #2: mulher, JAK2<sup>V617F</sup> positivo) em seguimento regular no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRPUSP). A coleta e utilização de amostra biológica humana foi aprovada perante submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP-USP (Parecer 4.306.679) (ANEXO A). Amostras de sangue periférico foram coletadas em EDTA e processadas imediatamente. As amostras foram submetidas a separação por gradiente, utilizando Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) para a obtenção das mononucleares, seguida de lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio e ensaio de formação de colônias.

#### 3.2. Linhagens celulares

A célula Ba/F3 transformada com a JAK2<sup>V617F</sup> ou JAK2<sup>WT</sup> e células WEHI-3B foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Susumu Kobayashi, do *Beth Israel Deaconess Medical Center/Harvard Medical School*, e cultivadas em meio RPMI, acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina e enriquecido com 10% de soro bovino fetal. Células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> positivas para luciferase foram previamente transformadas por nosso grupo de pesquisa. As células foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Células WEHI-3B foram utilizadas para produção de meio condicionado com IL3 murina, necessário para manutenção das células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>.

Ba/F3 é uma linhagem celular hematopoética murina dependente de interleucina (IL) - 3. As células Ba/F3 foram caracterizadas pela primeira vez por Palacios e Steinmetz em um esforço para isolar células pró-B dependentes de IL-3 da medula óssea de camundongos Balb/c<sup>99</sup>. Em um experimento marcante logo depois disso, Daley e Baltimore demonstraram que a expressão dirigida da tirosina quinase Bcr-Abl1 foi suficiente para tornar células Ba/F3 independentes de IL-3. Embora esse experimento tenha ajudado a validar o Bcr-Abl1 como o oncogene causador da LMC, ele também lançou o uso de células Ba/F3 como uma ferramenta

amplamente utilizada na pesquisa do câncer<sup>100</sup>. A utilidade da Ba/F3 na pesquisa e descoberta de drogas é principalmente baseada nas seguintes características dessas células: (1) As células Ba/ F3 são uma linhagem de células em suspensão de crescimento rápido que facilita uma rápida reviravolta experimental; (2) as células Ba/F3 são facilmente transfectadas por eletroporação e são prontamente suscetíveis à infecção pelos sistemas de expressão retro e lentiviral comumente usados; e (3) as células Ba F3 proliferam e sobrevivem na ausência de IL-3 quando expressam uma tirosina quinase constitutivamente ativa ou outros oncogenes. As células Ba/F3 são frequentemente usadas para caracterizar o potencial de transformação de mutações de quinase recentemente identificadas e para estudar os mecanismos de sinalização de tais quinases mutantes. Além disso, as células Ba/F3 são usadas para avaliar o potencial de inibidores tanto *in vitro* quanto *in vivo* e para rastrear possíveis mutações que induziriam resistência aos inibidores<sup>101</sup>.

Células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, sem adição de meio condicionado, foram utilizadas para estudar o efeito de inibidores farmacológicos em modelo de neoplasia induzido pela ativação da mutação JAK2<sup>V617F</sup>. Células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, com adição de meio condicionado, foram utilizadas como controle para demonstrar que a ativação das vias é induzida pela mutação JAK2<sup>V617F</sup> e não se espera mudança nos resultados em relação a mesma célula sem adição de meio condicionado.

Células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>, com adição de meio condicionado com IL3 murina 10%, foram utilizadas para estudar o efeito de inibidores farmacológicos em modelo de célula com JAK2 selvagem; entretanto, o meio condicionado gera ativação das vias de sinalização de forma independente da mutação JAK2<sup>V617F</sup>. Células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>, sem adição de meio condicionado, foram utilizadas em paralelo como controle para demonstrar que a célula não sobrevive na ausência do meio condicionado, não sendo um bom modelo para avaliação do efeito das drogas.

### 3.3. Inibidores farmacológicos

Os compostos NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 foram adquiridos da empresa Selleck Chemicals e a concentração de estoque foi de 10 mM. Para experimentos *in vitro* os inibidores farmacológicos NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 foram diluídos em DMSO. Diferentes doses e tempos de tratamento foram testados para a definição da IC<sub>50</sub> de cada linhagem celular que foi utilizada no projeto. As linhagens celulares ou células primárias de



camundongos JAK2<sup>V617F</sup> *knockin* ou pacientes com mielofibrose primária foram submetidas ao tratamento com o inibidor farmacológico de interesse ou veículo (DMSO), e submetidas a ensaios funcionais e/ou análise de expressão e fosforilação de proteínas das vias de sinalização de interesse. Os inibidores farmacológicos NT157 e OSI-906 foram utilizados para tratamento *in vivo* de modelo murino JAK2<sup>V617F</sup> *knockin*. Um resumo do esquema de tratamento e das avaliações realizadas está indicado na **Tabela 1**.

**Tabela 1. Modelos experimentais**

<b>Ensaio</b>	<b>Modelo</b>	<b>Droga</b>	<b>Ensaio funcional</b>
<i>In vitro</i>	Células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> e Ba/F3 <sup>WT</sup>	NT157, OSI-906 e NVP-AEW54	Viabilidade, apoptose, proliferação celular e western blotting
	Células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup> *	OSI-906	Autofagia
	Células hematopoéticas primárias	NT157 e OSI-906	Formação de colônia
<i>Ex vivo</i>	Células de camundongo JAK2 <sup>V617F</sup> <i>knockin</i>	NT157 e OSI-906	Viabilidade, western blotting e formação de colônia
<i>In vivo</i>	Camundongo JAK2 <sup>V617F</sup> <i>knockin</i>	NT157 e OSI-906	Obtenção de células hematopoéticas
	Camundongo de NMP induzido por células Ba/F3 JAK2 <sup>V617F</sup>	OSI-906	Peso dos tumores

### 3.4. Animais

Os animais utilizados no estudo foram mantidos no Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto. Durante os experimentos, os animais foram alojados em estantes ventiladas de pressão positiva, mantidos em grupos com quatro indivíduos em caixas com dimensões de 10x30 cm, forradas com maravalha. A limpeza das caixas foi realizada duas a três vezes por semana e o regime alimentar composto por água autoclavada e ração à vontade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O parecer de aprovação (Protocolo CEUA 0052/2017) encontra-se no **ANEXO B**.

### **3.5. Ensaios funcionais**

Linhagens celulares murinas BA/F3 JAK2<sup>WT</sup> e BA/F3 JAK2<sup>V6A7F</sup>, e células de camundongos expressando a forma mutada (V617F) e selvagem da proteína JAK2 foram tratadas com veículo ou com inibidores farmacológicos de IGF1R/IRS, e submetidas aos ensaios de viabilidade, proliferação e apoptose. Todas as condições foram testadas em duplicata, em pelo menos três experimentos independentes conforme detalhado a seguir:

#### **3.5.1. Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT). Um total de  $1 \times 10^4$  células/poço foram semeadas em placas de 96 poços na presença de NT157 (Ø [DMSO]; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM), OSI-906 (Ø [DMSO]; 2,5; 5; 10; 20 e 40 µM) e NVP-AEW54 (Ø [DMSO]; 2; 4; 6; 8 e 10 µM). Após o período de tratamento (24, 48 e 72 horas), foram adicionados 10µL de uma solução de MTT (5mg/mL) aos poços e as placas foram incubadas à 37°C por 4 horas. Para interromper a reação, foram adicionados 100µL de 0,1N HCl em isopropanol. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pela mensuração da absorbância à 570nm por espectrofotometria. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados por meio de regressão não linear, utilizando-se o programa CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO, EUA).

#### **3.5.2. Avaliação de apoptose**

A indução de apoptose foi verificada através da marcação com anexina V-APC e iodeto de propídio (PI) através de citometria de fluxo e confirmada pela avaliação da atividade das caspases por *Western blot*. Células foram cultivadas em placas de 24 poços, seguindo-se as mesmas condições de tratamento utilizadas para o ensaio de viabilidade celular. Após o tratamento (48 horas), as células foram lavadas com PBS gelado e ressuspendidas em um tampão de ligação contendo 1 µg/mL de PI e 1 µg/mL de anexina V

conjugada com APC. As amostras foram incubadas por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente e analisadas em equipamento FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA). Para cada amostra, foram adquiridos dez mil eventos. As análises foram realizadas com o programa FlowJo (Treestar, Inc., San Carlos, CA, EUA). Em paralelo, extrato total das células foram obtidos e submetidos a *Western blot* com anticorpos específicos para caspase 3 (total e clivada).

### 3.5.3. Avaliação da proliferação celular

A análise de proliferação celular foi realizada através da marcação para Ki-67. Células foram tratadas com NT157 (Ø; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM) OSI-906 (Ø [DMSO]; 2,5; 5; 10; 20 e 40 µM) e NVP-AEW54 (Ø [DMSO]; 2; 4; 6; 8 e 10 µM) por 24 horas, fixadas com etanol 70% e armazenadas em freezer -20°C. O ensaio de marcação com o antígeno Ki-67 foi realizado de acordo com a orientação do fabricante (Ki-67 FITC clone B56; BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e a média da intensidade de fluorescência foi obtida através do aparelho FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA). Isótopo IgG foi utilizado como controle negativo. As análises foram realizadas com o programa FlowJo (Treestar).

### 3.6. Western Blotting

Ao precipitado celular (*pellet*) contendo  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células foi adicionado tampão de extração de proteínas contendo: 100 mM Tris (pH 7.6); 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 2 mM PMSF; 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 100 mM NaF; 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em gelo por 1 hora, e em seguida submetidas à centrifugação por 20 minutos a 4°C para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de *Laemmli* contendo 100 mmol/L de ditiotreitol, as amostras foram aquecidas em banho seco à temperatura de 95°C por 10 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5-8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA), para a separação das proteínas. A transferência das proteínas de interesse do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada durante 2 horas a 120 V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 2 horas com tampão de bloqueio (5% leite em pó, 10 mM Tris, 150 mM NaCl,

e 0.02% Tween 20) a temperatura ambiente. A membrana de nitrocelulose foi incubada durante a noite a 4°C com os anticorpos de interesse diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó), seguido de 3 lavagens com solução basal (10 mM Tris, 150 mM NaCl, e 0.02% Tween 20). Por fim, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado à HRP (Horseradishperoxidase), lavada novamente por 3 vezes, e então submetida ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado pelo aparelho foto-documentador Gel Doc XR+ system (Bio-Rad, USA). A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão da actina e a intensidade da fosforilação proteica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente. Os anticorpos utilizados estão descritos na **Tabela 2**.

**Tabela 2. Anticorpos utilizados para *Western blotting*.**

<b>Empresa</b>	<b>Proteína alvo</b>	<b>Número de catálogo</b>	<b>Concentração</b>
Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	IRS-2	sc-390761	1:500
	STAT3	sc-7179	1:1000
	STAT5	sc-835	1:1000
	p-P70S6K	sc-7984-R	1:1000
	P70S6K	sc-8418	1:1000
	$\alpha$ -tubulina	sc-5286	1:4000
Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	IRS-1	#3407P	1:1000
	p-IGF1R	#3918	1:500
	IGF1R	#9750	1:1000
	p-STAT3	#9131S	1:1000
	p-STAT5	#9359S	1:1000
	caspase 3	#9665	1:1000
	p-AKT1/2/3	#4060	1:500
	AKT1/2/3	#4685	1:1000
	p-4EBP1	#9455	1:1000
4EBP1	#9452	1:4000	
Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	p-ERK1/2	700012	1:1000
	ERK1/2	44654G	1:1000

### 3.7. Avaliação do crescimento clonal

O crescimento clonal foi avaliado através da formação de colônias. As células primárias de pacientes com mielofibrose primária ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em meio semi-sólido methocult (H4535) (StemCell Technologies), na ausência ou presença de NT157 (3,2; 6,4  $\mu\text{M}$ ) e OSI-906 (10 e 20  $\mu\text{M}$ ). Células primárias de modelo murino JAK2<sup>V617F</sup> knockin ( $1 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas em meio semi-sólido methocult (M3534) (StemCell Technologies), na ausência ou presença de NT157 (6,4  $\mu\text{M}$ ) e OSI-906 (10 e 20  $\mu\text{M}$ ). Cada condição foi realizada em duplicata. As colônias humanas foram detectadas após 14 dias de cultivo e as colônias murinas após 10 dias de cultivo. A contagem diferencial de colônias eritrocíticas (CFU-E), granulocíticas (CFU-G), megacariocíticas (CFU-M), grânulo-monocíticas (CFU-GM) e multi-linhagem (CFU-GEMM) foi realizada através de diferenças morfológicas observadas ao microscópio convencional.

### 3.8. Avaliação da autofagia

Células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup> tratadas com OSI-906 por 48 horas foram submetidas ao ensaio de autofagia com o marcador laranja de acridina. Resumidamente, as células foram centrifugadas por 5 minutos, ressuspendidas em solução de 1mg/mL de laranja de acridina, seguido de incubação por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas, ressuspendidas em PBS e lidas nos canais FL1 e FL3 no citômetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, EUA).

### 3.9. Modelo murino de transplante de NMP induzido por células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>

Células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> previamente testadas e positivas para a atividade de luciferase, foram cultivadas em meio RPMI 10% de soro bovino fetal até atingirem crescimento exponencial e viabilidade igual a 95%. Fêmeas imunossuprimidas NOD-scid IL2Rgnull (NSG) de 10 a 12 semanas de vida, receberam injeção subcutânea dorsal contendo  $5 \times 10^6$  células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> viáveis ressuspendidas em 50ul de PBS e 50ul de Matrigel. A formação do tumor foi avaliada por meio de injeção intraperitoneal de D-luciferina (150mg/kg). Após aproximadamente 5 minutos, período de difusão da enzima, os

camundongos receberam anestesia inalatória (2,5% de isoflurano em oxigênio) e foram posicionados no equipamento IVIS. Durante o período da captura das imagens, a sedação foi mantida por exposição constante ao isoflurano (1,5%). O tempo de exposição variou de 10 segundos a 3 minutos, dependendo da intensidade do sinal. A intensidade da bioluminescência foi quantificada através da seleção manual da região que abrange o sinal, utilizando a ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*), disponibilizada pelo software utilizado para operar o equipamento (Living Image 3, Perkin Elmer). A intensidade é contabilizada como fluxo de fótons e expressa em fótons/s. Após a constatação da formação do tumor pela análise da quimioluminescência, os camundongos foram randomizados em dois grupos: animais submetidos à administração de veículo (25 mM de ácido tartárico) (n=9) e animais tratados com OSI-906 (70 mg/kg) (n=7), ambos administrados por gavagem 1 vez ao dia. O tratamento com OSI-906 seria realizado por um tempo previsto de 15 dias, com base na literatura encontrada <sup>102; 103; 104</sup>, porém, o mesmo precisou ser interrompido e os animais sacrificados devido a perda significativa de peso, após 7 dias. Ao final dos 7 dias os tumores foram removidos e pesados.

### **3.10. Modelo murino com expressão condicionada da mutação JAK2<sup>V617F</sup>**

O modelo murino com mutação JAK2<sup>V617F</sup> foi cedido pela pesquisadora Dr.<sup>a</sup> Ann Mullally <sup>46</sup> e modificado e estabelecido no Centro de Terapia Celular (CTC) do Hemocentro de Ribeirão Preto pela prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lorena Lobo de Figueiredo-Pontes (FAPESP 2015/21866-1). O controle da expressão da mutação no modelo murino é exercido pelo promotor murino endógeno de JAK2. Os animais JAK2 WT/Fl não expressam o JAK2 mutado e não tem fenótipo clínico, pois a expressão da mutação está sob regulação da enzima cre-recombinase. Após cruzamento de JAK2 WT/Fl com animais transgênicos Vav/Cre, nos quais a cre-recombinase é expressa sob o controle do promotor murino Vav, especificamente em células das linhagens hematopoética e endotelial, a expressão da JAK2<sup>V617F</sup> é obtida. A recombinação 35 cre ocorre em duas etapas, uma que remove o éxon WT e a outra que coloca V617F em orientação normal para a transcrição. A estratégia utilizada para produção dos animais geneticamente modificados foi previamente descrita <sup>105</sup>.

### **3.10.1. Avaliação do efeito do tratamento com os inibidores farmacológicos da via IGF1R/IR (OSI-906) e IGF1R/IRS (NT157) em modelo murino de NMP JAK2<sup>V617F</sup> knockin *in vivo***

Camundongos receptores Pep/boy C57BL/6 CD45.1 foram letalmente irradiados com 7Gy de raios X, divididas em 2 doses com intervalo de 4 horas. Camundongos JAK2 WT/Fl- - Vav/Cre CD45.2 doadores foram eutanasiados com sobredose de cetamina (300mg/kg) e xilazina (30mg/kg), e submetidos a maceração de fêmures, tíbias e coluna vertebral para obtenção da MO. Cinco milhões ( $5 \times 10^6$ ) de células totais da MO dos camundongos doadores foram injetadas via plexo retro-ocular nos camundongos receptores Pep/boy C57BL/6 CD45.1 letalmente irradiados. Após o transplante de medula óssea (TMO), realizou-se antibioticoterapia profilática nos camundongos transplantados através da administração de enrofloxacino 5gm/kg durante 05 dias via subcutânea. O quimerismo dos animais transplantados foi analisado por citometria de fluxo pela marcação dos leucócitos em sangue periférico utilizando os marcadores FITC-CD45.1 e PE-CD45.2 (BectonDickinson, EUA) 4 semanas após o TMO. Os grupos experimentais, tratados e controles, foram pareados segundo peso, quimerismo e hemograma.

O tratamento com NT157 (70 mg/kg), ou veículo (2-Hidroxipropil Beta-Ciclodextrina 20%) teve início após a avaliação do quimerismo e foi feito em dias alternados, ambos via intraperitoneal, tendo duração de 6 semanas, seguido de eutanásia e coleta de sangue periférico, medula e baço. O tratamento com OSI-906 (50 mg/kg) ou veículo (25 mM de ácido tartárico), ambos administrados via oral por gavagem 1 vez ao dia por 5 dias consecutivos seguido de pausa por 2 dias. Ao final das 7 semanas foi realizada eutanásia dos animais e coleta de sangue periférico, medula e baço para avaliação dos parâmetros hematológicos.

### **3.10.2. Obtenção de células hematopoéticas de modelo murino JAK2<sup>V617F</sup>**

Camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2 foram anestesiados e tiveram seu sangue coletado em tubos minicollect (Vacuette) de 1mL contendo EDTA, para análise do hemograma. A obtenção das células de medula óssea foi realizada por meio da coleta de fêmures e tíbias através da maceração desses órgãos e a passagem em Strainer (BD®) de 70µm para a retirada de agregados celulares e resquícios de ossos. As

células do baço foram obtidas pelo mesmo processo. As células foram mantidas em PBS com 3% de soro bovino fetal em gelo. As hemácias foram lisadas com tampão de lise por 15 minutos a 4°C seguidas de duas lavagens com PBS. As células da medula óssea, sangue periférico e baço foram contadas e separadas para caracterização das subpopulações de células-tronco e progenitores hematopoéticos.

### 3.10.3. Análise das populações hematopoéticas murinas por citometria de fluxo

Para estimação das células tronco hematopoéticas,  $1 \times 10^6$  células submetidas à lise de eritrócitos e ressuspensas em PBS foram incubadas por 15 minutos com anticorpos específicos, lavadas e ressuspensas em PBS para análise por citometria de fluxo. As subpopulações de células-tronco e progenitoras hematopoéticas foram avaliadas como frações da população LSK ( $\text{Lin}^- \text{Sca}^{1+} \text{c-Kit}^{\text{Hi}}$ ), pelos imunofenótipos: células-tronco de longo prazo (LT-HSC)  $\text{CD48}^- \text{CD150}^+$ , células-tronco de curto prazo (ST-HSC)  $\text{CD48}^+ \text{CD150}^+$  e progenitores multipotentes (MPP)  $\text{CD48}^+ \text{CD150}^-$ . Para quantificação dos precursores eritroides ( $\text{CD71}^- \text{Ter119}^-$ ,  $\text{CD71}^+ \text{Ter119}^-$ ,  $\text{CD71}^+ \text{Ter119}^+$ ), as células-tronco obtidas dos animais tratados ou não com OSI-906 e NT157 foram submetidas à lise de eritrócitos e foram marcadas com os anticorpos definidores de linhagem eritroides CD71 e Ter119 (Tabela 2). A aquisição dos eventos foi realizada em citômetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, EUA) e a análise feita usando o software FlowJo v.9.6.3. (Treestar, Inc., EUA). A definição do imunofenótipo está indicado na **Tabela 3**. A lista de anticorpos utilizados está indicada na Tabela 4.

**Tabela 3. Imunofenótipo de células tronco e progenitoras hematopoéticas avaliados.**

<b>Linhagem celular</b>	<b>Anticorpos</b>
Progenitor mieloide	$\text{Lin}^- \text{Sca}^{1+} \text{c-Kit}^{\text{Hi}}$
Progenitor eritroide	CD71 e Ter119
Célula-tronco hematopoética:	
Progenitor Multipotente	$\text{Lin}^- \text{Sca}^{-1+} \text{c-Kit}^+ \text{CD48}^+ \text{CD150}^-$
Long-term	$\text{Lin}^- \text{Sca}^{-1+} \text{c-Kit}^+ \text{CD48}^- \text{e CD150}^+$
Short-term	$\text{Lin}^- \text{Sca}^{-1+} \text{c-Kit}^+ \text{CD48}^+ \text{e CD150}^+$



**Tabela 4. Anticorpos utilizados para a marcação de células-tronco e progenitores hematopoéticos .**

<b>Anticorpo</b>	<b>Catálogo (BioLegend)</b>
Fitc streptovidim	405202
CD11b-PE	101208
CD71-APC	17071182
APC-CY7 CD3e	100330
PercP streptovidim	405213
CD48 - FITC	336705
CD34 - FITC	343606
CD16/32 - PE	360703
B220 PECY7	103221

### **3.11. Avaliação do efeito do tratamento com os inibidores farmacológicos da via IGF1R/IR (OSI-906) e IGF1R/IRS (NT157) em modelo murino de NMP JAK2<sup>V617F</sup> knockin *ex vivo***

Camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2 foram anestesiados e tiveram seu sangue coletado em tubos minicollect (Vacuette) de 1mL contendo EDTA, para análise do hemograma. A obtenção das células de medula óssea foi realizada por meio da coleta de fêmures e tíbias através da maceração desses órgãos e a passagem em Strainer (BD®) de 70µm para a retirada de agregados celulares e resquícios de ossos. As células do baço foram obtidas pelo mesmo processo. As células foram mantidas em PBS com 3% de soro bovino fetal em gelo. As hemácias foram lisadas com tampão de lise por 15 minutos a 4°C seguidas de duas lavagens com PBS. As células da medula óssea foram contadas e utilizadas em ensaios de viabilidade, *Western blotting* e formação de colônia.

# ***RESULTADOS***

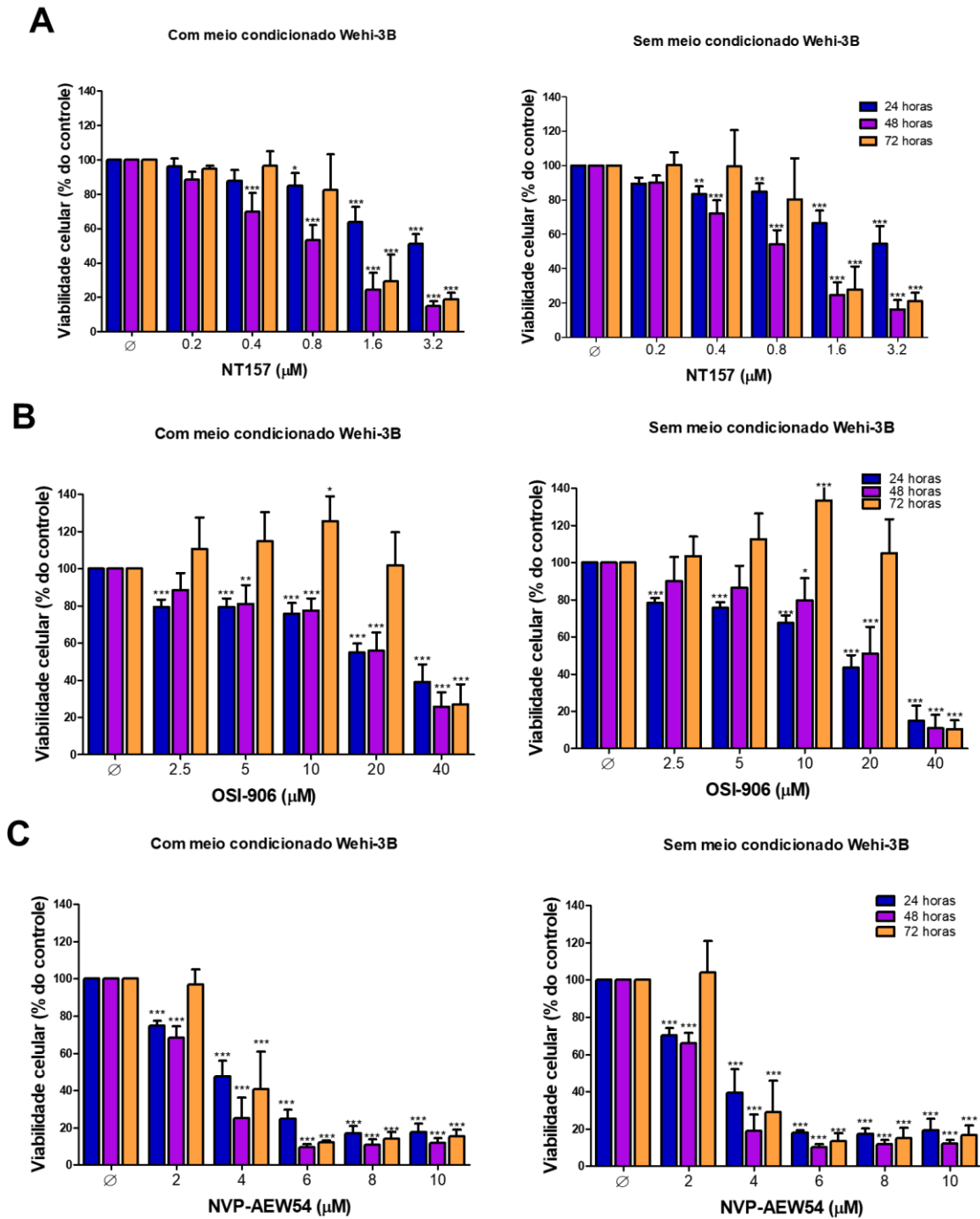
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação do efeito dos inibidores farmacológicos de IGF1R-IRS1/2 na viabilidade, apoptose, proliferação e análise de expressão e fosforilação de proteínas nas linhagens celulares Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> e Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>

#### 4.1.1. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na viabilidade de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>

A viabilidade das células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, sem meio condicionado por Wehi-3B, tratadas com NT157 foi significativamente reduzida em relação ao controle a partir da dose 0.4  $\mu$ M após 24 e 48 horas de incubação (**Figura 4A**). A viabilidade das células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> tratadas com OSI-906 foi significativamente reduzida em relação ao controle a partir da dose 10  $\mu$ M nos tempos de 24 e 48 horas (**Figura 4B**). A viabilidade da célula Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> tratada com NVP-AEW54 foi significativamente reduzida em relação ao controle a partir da dose de 2  $\mu$ M em todos os tempos de tratamento (**Figura 4C**). A viabilidade das células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, com meio condicionado por Wehi-3B, tratadas com NT157, OSI-906 e NVP-AEW54, foi significativamente reduzida (**Figura 4 A-C**, painel esquerdo) de forma semelhante às células correspondentes cultivadas sem o meio condicionado.

## Células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>



**Figura 4.** Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na viabilidade de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. A viabilidade celular da linhagem Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> foi determinada pelo ensaio de metylthiazolotetrazolium (MTT) após 24, 48 e 72 horas de incubação na ausência ( $\emptyset$  = controle) ou na presença de NT157 (A), OSI-906 (B) e NVP-AEW54 (C) e na presença (esquerda) ou ausência (direita) de meio condicionado por Wehi-3B que é rico em IL-3. Os resultados são representados como média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado com CT; Teste *t Student*.

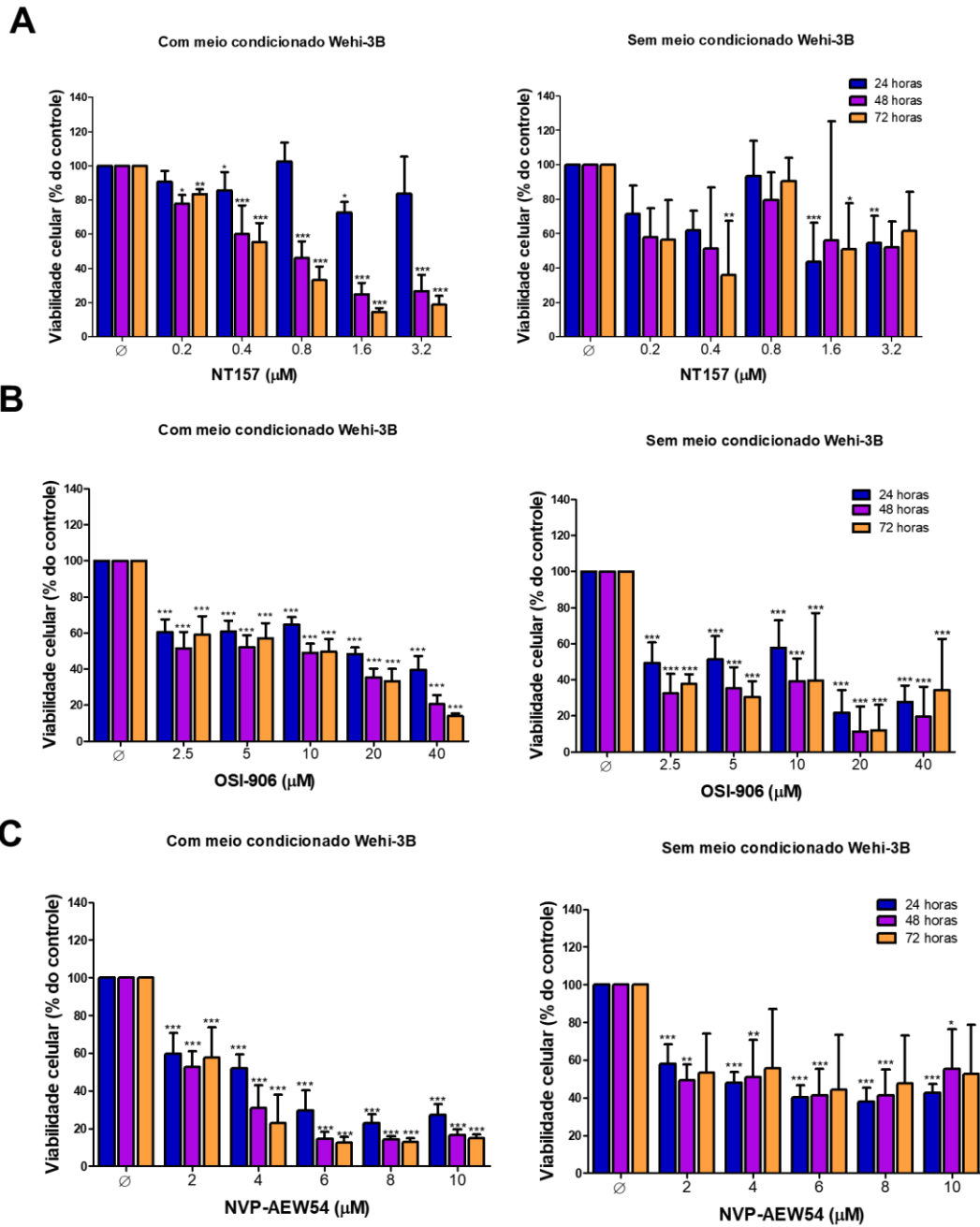
#### 4.1.2. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na viabilidade de células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>

Na tentativa de avaliar se a inibição de IGF1R/IRS era independente da mutação JAK2<sup>V617F</sup> nós utilizamos a linhagem Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>. Entretanto, a linhagem Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> precisa do meio Wehi-3B para crescer e ele é responsável por ativar a via JAK/STAT de forma independente da mutação JAK2<sup>V617F</sup>. Os 3 inibidores farmacológicos testados, reduziram a viabilidade das células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> em baixas doses.

A viabilidade das células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> tratadas com NT157, na presença de meio condicionado Wehi-3B, foi significativamente reduzida em relação ao controle a partir da dose 0.2  $\mu$ M após 48 e 72 horas de tratamento (**Figura 5A**). A viabilidade das células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> tratadas com OSI-906, na presença de meio condicionado por Wehi-3B, foi significativamente reduzida em relação ao controle a partir da dose 2,5  $\mu$ M em todos os tempos de tratamento (**Figura 5B**). A viabilidade da célula Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> com meio condicionado por Wehi-3B, tratada com NVP-AEW54 foi significativamente reduzida em relação ao controle a partir da dose de 2  $\mu$ M em todos os tempos de tratamento (**Figura 5C**).

A viabilidade das células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>, sem meio condicionado por Wehi-3B, tratadas com NT157, OSI-906 e NVP-AEW54, foi significativamente reduzida (**Figura 5 A-C**, painel direito) de forma semelhante às células correspondentes cultivadas com o meio condicionado.

## Células BAF3 JAK2<sup>WT</sup>

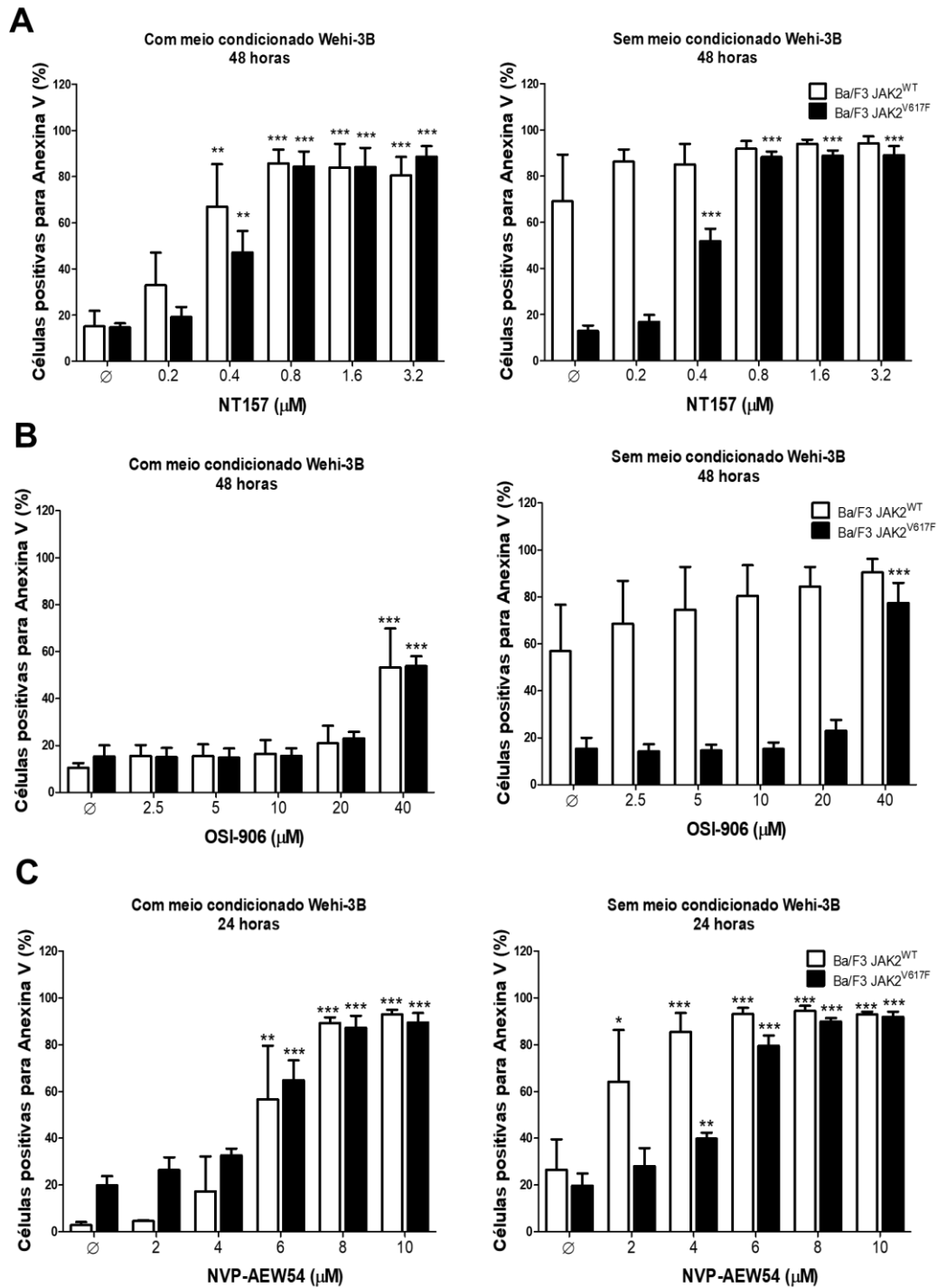


**Figura 5. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na viabilidade de células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>.** A viabilidade celular da linhagem Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> foi determinada pelo ensaio de methythiazolotetrazolium (MTT) após 24, 48 e 72 horas de incubação na ausência ( $\emptyset$  = controle) ou na presença de NT157 (A), OSI-906 (B) e NVP-AEW54 (C) e na presença (esquerda) ou ausência (direita) de meio condicionado por Wehi-3B que é rico em IL-3. Os resultados são representados como média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado com CT; Teste *t Student*.

#### 4.1.3. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na apoptose de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> e Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>

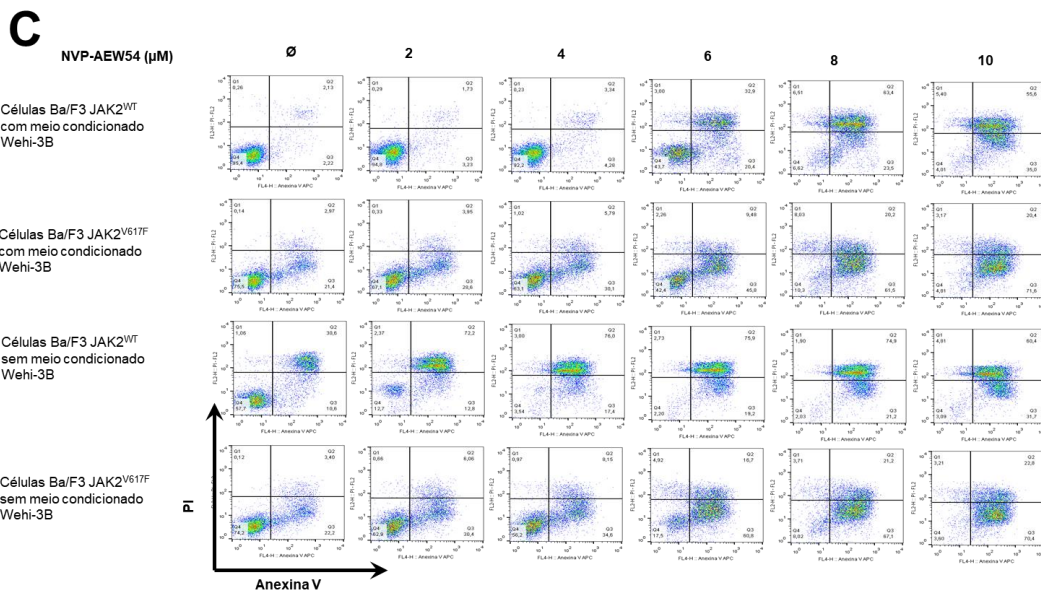
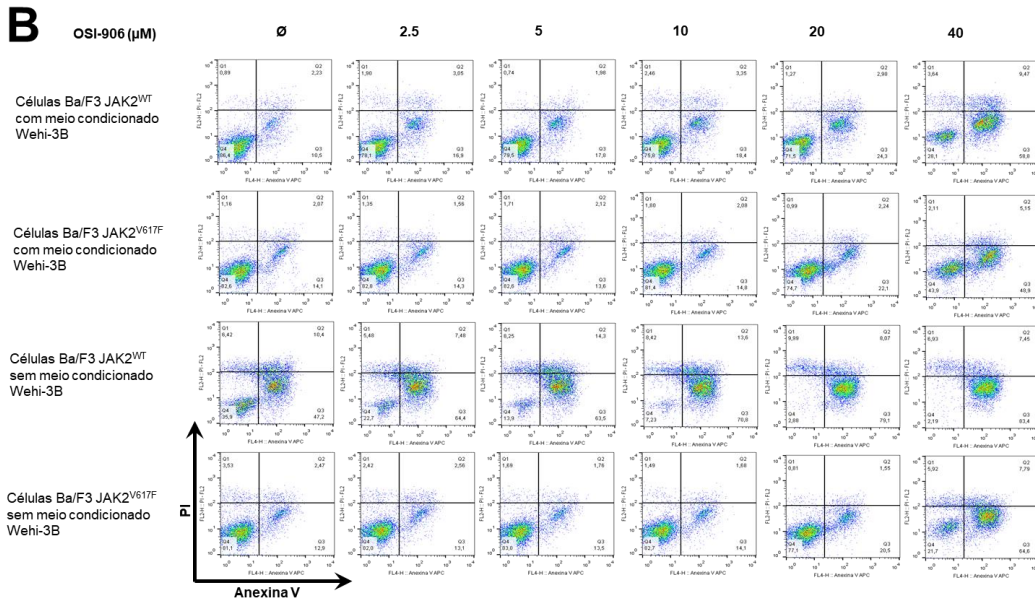
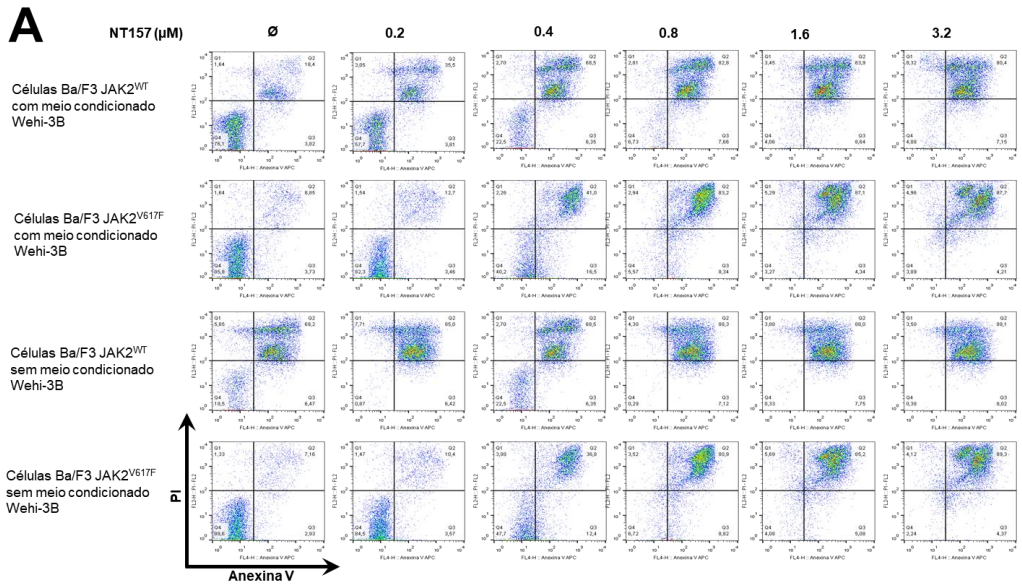
A partir dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, procuramos avaliar se a redução da viabilidade era acompanhada de aumento das taxas de apoptose. A inibição de IGF1R/IRS por NT157 ( $\geq 0.4 \mu\text{M}$ ), OSI-906 (apenas na dose de  $40 \mu\text{M}$ ) e NVP-AWE54 ( $\geq 4 \mu\text{M}$ ) aumentaram significativamente a porcentagem de células apoptóticas em relação ao controle em células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, cultivadas sem o meio condicionado por Wehi-3B (**Figura 6**, painel direito). Na presença do meio condicionado Wehi-3B a viabilidade das células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> tratadas com NT157, OSI-906 e NVP-AWE54 foi significativamente reduzida (**Figura 6**, painel esquerdo) de forma semelhante às células correspondentes cultivadas sem o meio condicionado.

Em células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> cultivadas com meio condicionado Wehi-3B (**Figura 6**, painel esquerdo), no qual a via JAK/STAT está ativada de maneira independente da mutação, os inibidores de IGF1R/IRS tiveram resultados semelhantes a célula Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. Na ausência de meio condicionado Wehi-3B, as células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> apresentaram altas taxas de apoptose (**Figura 6**, painel direito). Um *dot plot* representativo de um experimento de cada inibidor é ilustrado (**Figura 7**). A indução da apoptose foi confirmada através do aumento da clivagem de caspase 3, verificada por *western blotting*, em extrato celular total de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de NT157 (**Figura 8A**), OSI-906 (**Figura 8B**) e NVP-AEW54 (**Figura 8C**).

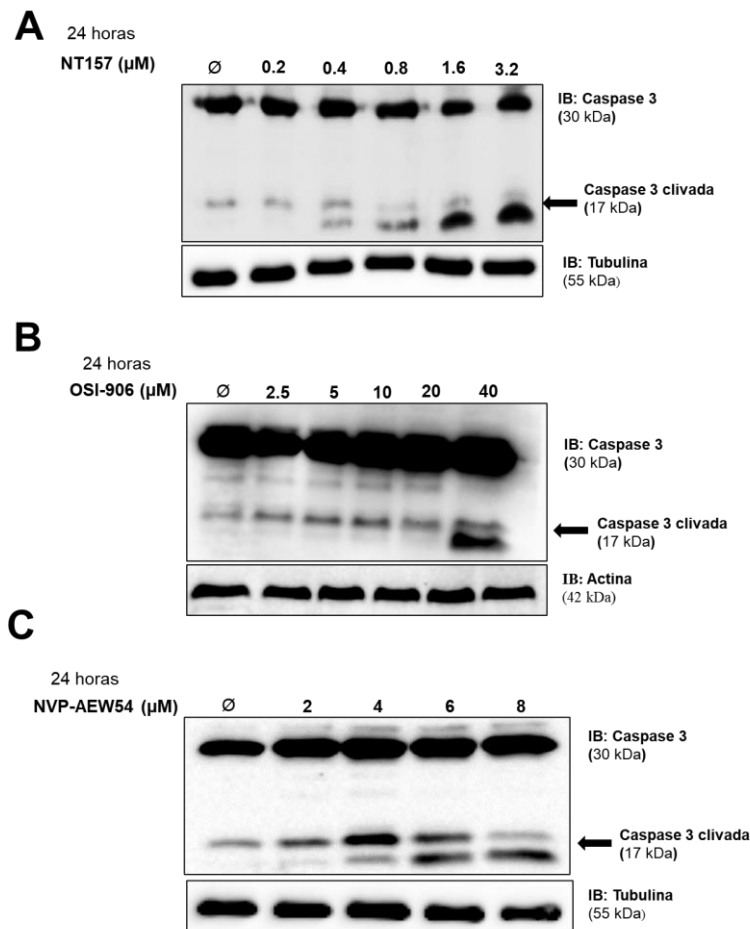


**Figura 6. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na apoptose de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> e Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>.** A apoptose foi analisada através da avaliação de Anexina V/PI por citometria de fluxo nas células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> e Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> após 48 horas de incubação na ausência ( $\emptyset$  = controle) ou na presença de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 e na presença (esquerda) ou ausência (direita) de meio condicionado Wehi-3B rico em IL-3. A porcentagem (%) de células apoptóticas (AnexinaV+/PI- e Anexina V+/PI+) foi comparada entre as células controles (CT) e tratadas com NT157 (A), OIS-906 (B) e NVP-AEW54 (C) em diferentes doses; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 e \*\*\* $p$ <0.001; Teste *t Student*.





**Figura 7.** *Dot plot* representativo de um experimento de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 em células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> e Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>. A apoptose foi analisada através da avaliação de Anexina V/PI por citometria de fluxo nas células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> e Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup> após 48 horas de incubação na ausência ( $\emptyset$  = controle) ou na presença de NT157 (A), OSI-906 (B) e NVP-AEW54 (C) e na presença ou ausência de meio condicionado Wehi-3B rico em IL-3.; Um *dot plot* representativo de um experimento de cada inibidor é ilustrado.

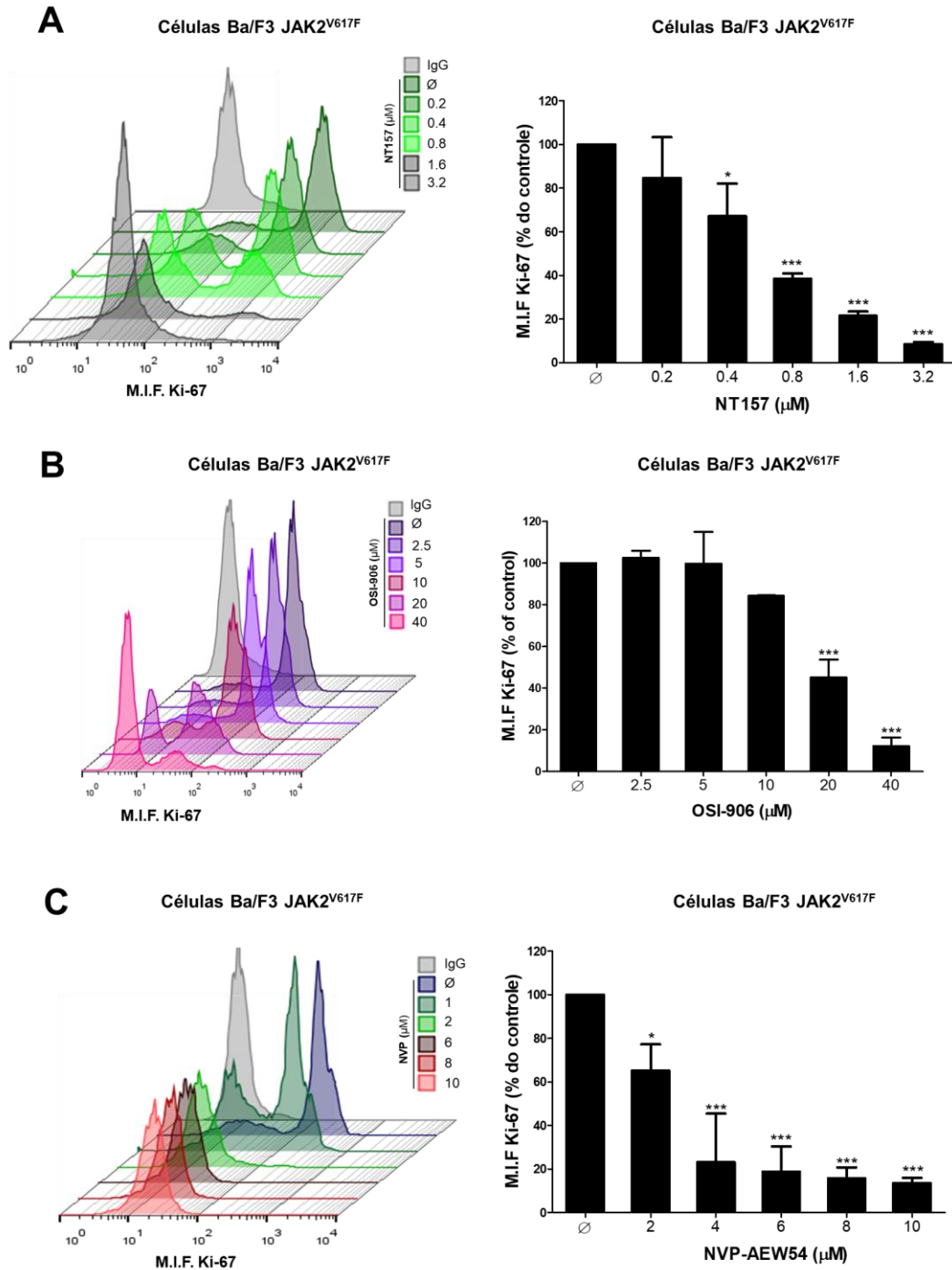


**Figura 8.** *Western blotting* de caspase 3 em células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. Tratamento com NT157 (A), OSI-906 (B) e NVP-AEW54 (C) provocou aumento nos níveis de caspase 3 clivada, conforme observado por *Western blotting*.  $\emptyset$  = controle.

#### 4.1.4. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na proliferação de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>

Decidimos seguir com os experimentos apenas com as células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> sem meio condicionado Wehi-3B, que representam o modelo de ativação da via JAK2/STAT induzida pela mutação JAK2<sup>V617F</sup>. A análise de Ki-67 revelou que a proliferação celular das

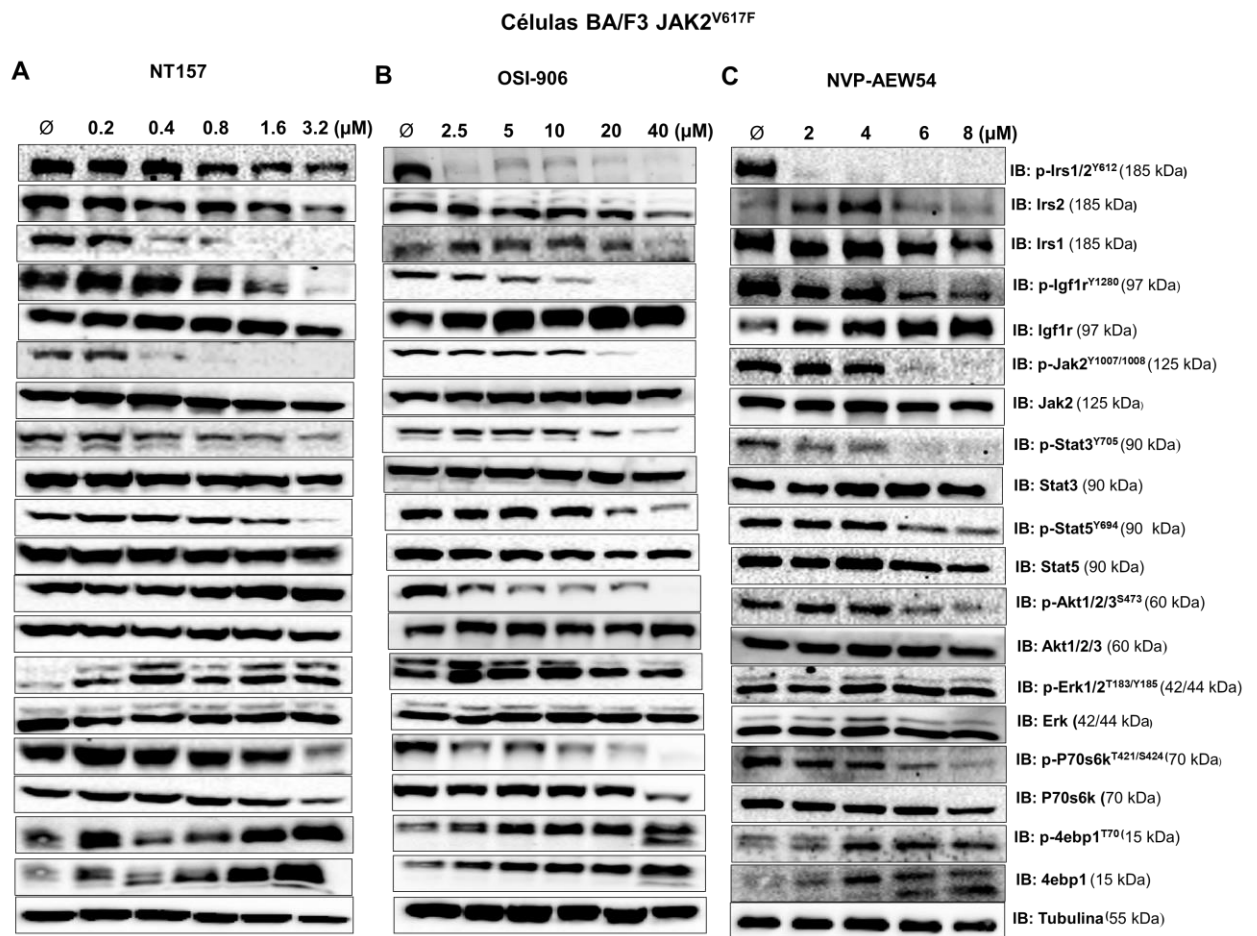
células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> foi significativamente reduzida a partir da concentração 0.4  $\mu\text{M}$  de NT157 (**Figura 9A**). OSI-906 reduziu a proliferação celular das células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> apenas a partir da concentração 20  $\mu\text{M}$  (**Figura 9B**). NVP-AEW54 reduziu a proliferação celular das células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> a partir da concentração 2  $\mu\text{M}$  (**Figura 9C**).



**Figura 9.** Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 na proliferação celular de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. A média da intensidade de fluorescência de Ki67 (M.I.F.) foi determinada por citometria de fluxo após incubação de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> com NT157 (A), OSI-906 (B) e NVP-AEW54 (C) por 24 horas; o histograma está ilustrado. O gráfico de barras representa a M.I.F. de Ki-67 normalizado pela respectiva célula não tratada, e os resultados são representados como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado com CT; teste ANOVA e Bonferroni.

#### 4.1.5. Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 em vias de sinalização de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>

A análise por *Western blotting* revelou que NT157, OSI-90 e NVP-AEW54 foram capazes de reduzir a fosforilação e expressão de Irs1/2, Igf1r, Jak2, Stat3, Stat5 e p70s6k na linhagem celular Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. O tratamento com NT157 aumentou a fosforilação de Erk1/2 e não modulou Akt1/2/3. NVP-AEW54 não modulou Erk1/2 (**Figura 10**).

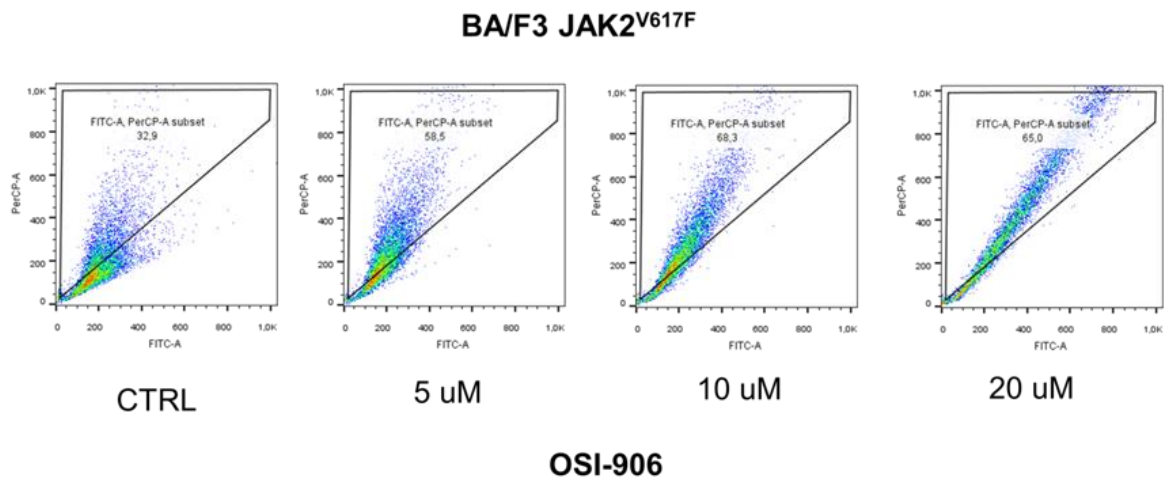


**Figura 10.** Efeito de NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 em vias de sinalização de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. Análise de *western blotting* para p-Irs1/2<sup>Y612</sup>, Irs1, Irs2, p-Igf1r<sup>Y1280</sup>, Igf1r, p-Stat3<sup>Y705</sup>, Stat3, p-Stat5<sup>Y694</sup>, Stat5, p-Erk1/2<sup>T183/Y185</sup>, Erk1/2, p-p70s6k<sup>T421/S424</sup>, p70s6k, caspase 3 (total e clivada) em extrato total de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> tratadas com as concentrações indicadas de NT157 (A), OSI-906 (B) e NVP-AEW54 (C); As membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos para detecção da proteína total ou actina e reveladas com o SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate system usando um Gel Doc XR+ imaging system.

#### 4.1.6. Efeito do OSI-906 na indução da autofagia em células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>

Uma vez que OSI-906 induziu apoptose apenas em altas doses em células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>, decidimos investigar o que poderia explicar esse fenômeno e testamos a hipótese que o OSI-906 induz a autofagia como mecanismo de resistência a apoptose.

Nós observamos um aumento no acúmulo de organelas vesiculares ácidas (AVOs) a partir da dose de 5uM de OSI-906 em células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>, o que indica aumento da autofagia nessas células (**Figura 11**). A indução da autofagia por OSI-906 pode explicar seu efeito limitado na apoptose em células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>.



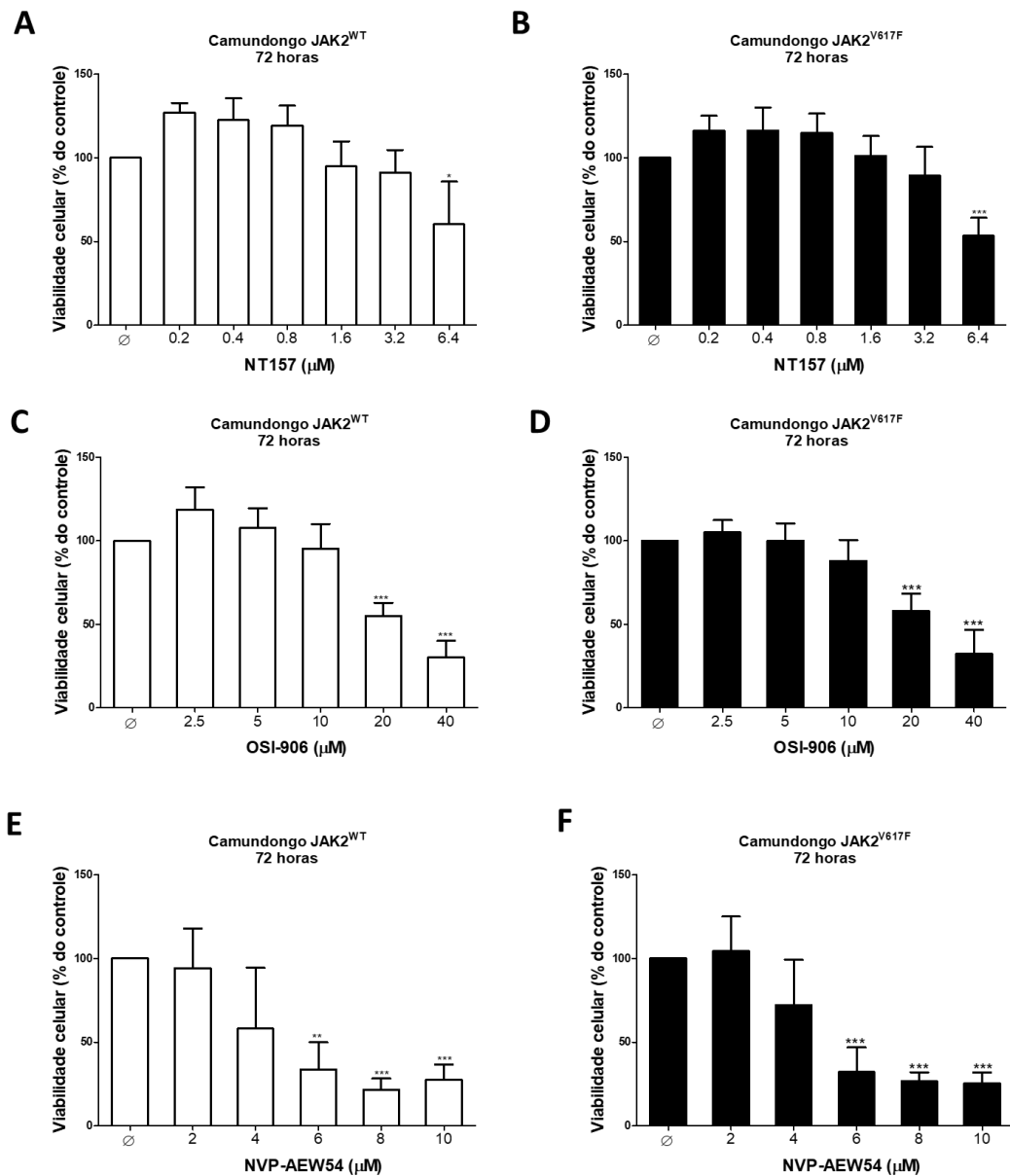
**Figura 11. OSI-906 induz autofagia em células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>.** Organelas vesiculares ácidas foram detectadas por citometria de fluxo em células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup> tratadas com OSI-906 em diferentes concentrações (CTRL [controle=veículo], 5, 10 e 20 uM) por 48 horas usando o método de marcação com laranja de acridina. A gate “AVO” contém células positivas pelo canal FL-3, o que é caracterizado por aumento na formação de organelas vesiculares ácidas.

## 4.2. Avaliação *ex vivo* do efeito dos inibidores farmacológicos de IGF1R-IRS1/2 em células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) ou selvagem da proteína JAK2

### 4.2.1. A inibição farmacológica de IGF1R/IR reduz a viabilidade de células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) ou selvagem da proteína JAK2

Avaliamos o impacto da inibição farmacológica de IGF1R/IRS (NT157, OSI-906 e NVP-AEW54) na viabilidade celular de células primárias murinas. Células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) ou selvagem da proteína JAK2 foram incubadas por 72

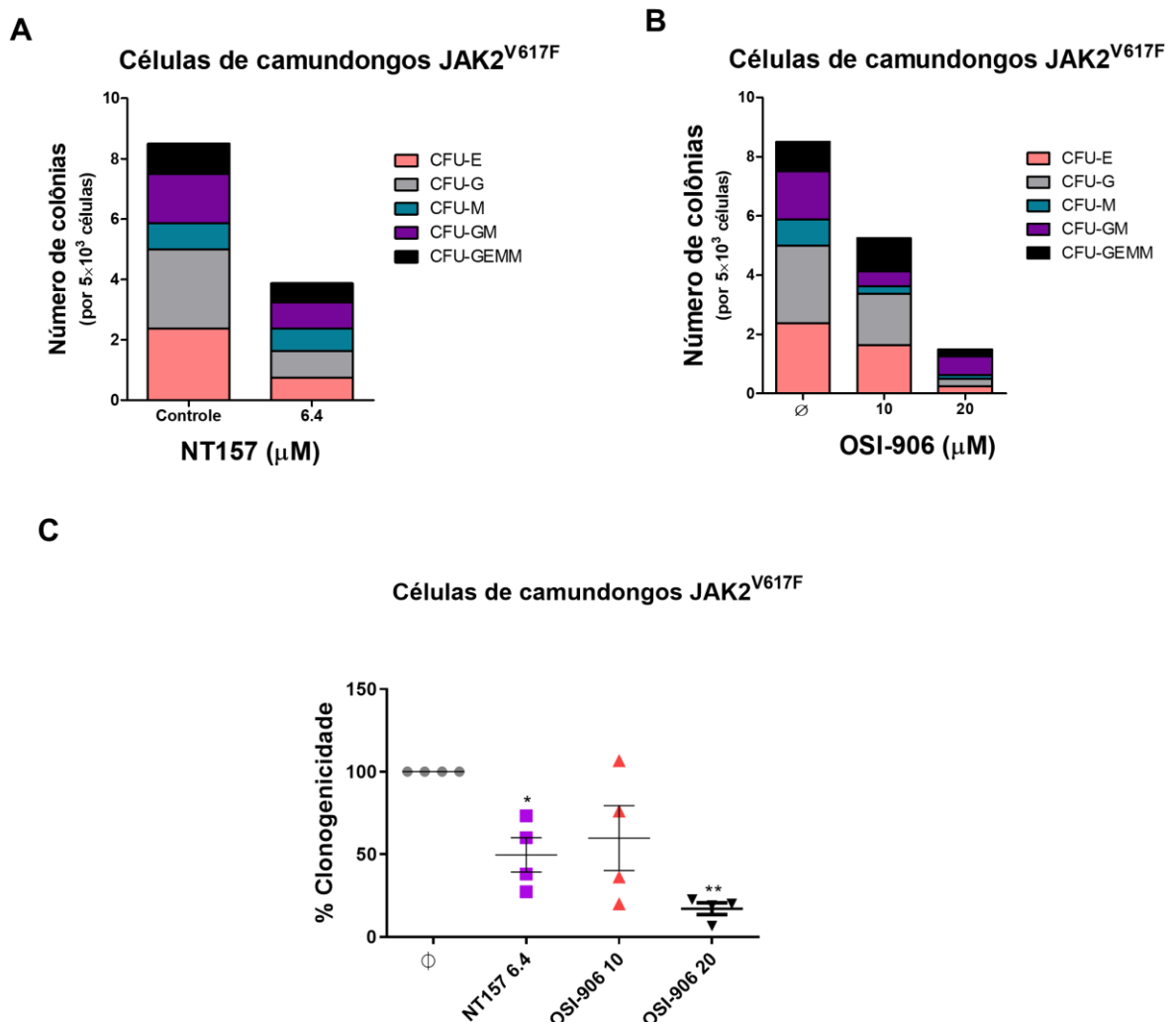
horas na ausência ou presença do NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 e submetidas ao ensaio de methythiazoletetrazolium (MTT). NT157 reduziu a viabilidade celular na dose 6,4  $\mu\text{M}$  e OSI-906 somente nas doses mais altas ( $\geq 20$   $\mu\text{M}$ ). NVP-AEW54 teve o melhor efeito, reduzindo a viabilidade celular a partir da dose  $\geq 6$   $\mu\text{M}$  (**Figura 12**).



**Figura 12.** Inibidores de IGF1R/IR reduziram a viabilidade de células de camundongos expressando a forma mutada (V617F) ou selvagem da proteína JAK2. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de methythiazoletetrazolium (MTT) após 72 de incubação na ausência (Ø = controle) ou na presença de NT157 (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 E 6.4  $\mu\text{M}$  (A-B), OSI-906 (2.5, 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ ) (C-D) e NVP-AEW541 (2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{M}$ ) (E-F). Os resultados são representados como média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes.

#### 4.2.2. A inibição farmacológica de IGF1R/IR reduziu a formação de colônias de células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2

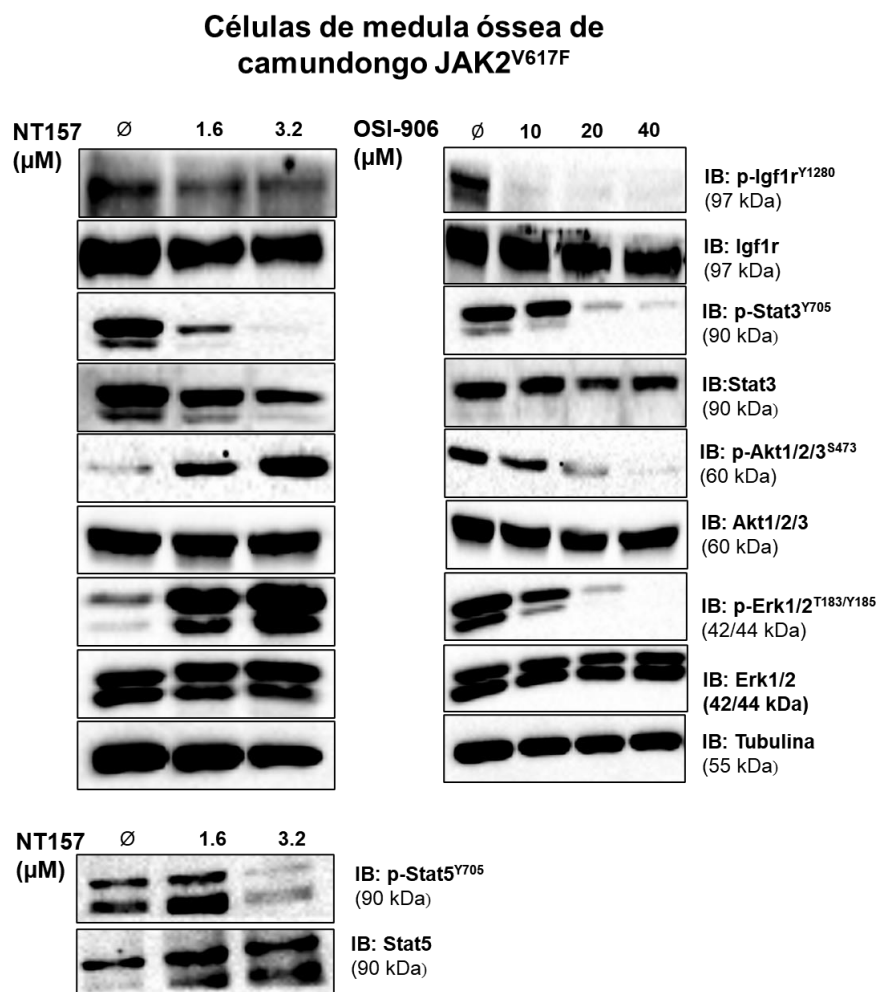
Células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2 foram incubadas por 72 horas na ausência ou presença do NT157 e OSI-906 submetidas ao ensaio de formação de colônias. NT157 reduziu a formação de colônia na dose de 6.4  $\mu\text{M}$  (Figura 13A). O tratamento com OSI-906 *in vitro* reduziu significativamente a formação de colônia a partir da dose de 20  $\mu\text{M}$  (Figura 13B).



**Figura 13.** O tratamento com OSI-906 e NT157 *in vitro* reduz a formação de colônias em células da medula óssea de camundongos expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2. Células foram isoladas e plaqueadas em metilcelulose enriquecida com citocinas e incubadas por 10 dias com a concentração indicada de OSI-906 e NT157. Os resultados indicam o número de colônias formadas a partir de células progenitoras e diferenciadas em colônias eritrócíticas (CFU-E), granulocíticas (CFU-G), megacariocíticas (CFU-M), grânulo-monocíticas (CFU-GM) e multi-linhagem (CFU-GEMM) (A-B). O número de colônias de células da medula óssea de camundongos expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2 normalizada por células progenitoras não tratadas (C) está ilustrado. Análise de significância entre as células tratadas com OSI-906 *versus* células não tratadas foi feita utilizando ANOVA e Bonferroni; \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

### 4.2.3. A inibição farmacológica de IGF1R/IR modulou vias de sinalização em células da medula óssea de camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2

Células de camundongo expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2 foram incubadas por 24 horas na ausência ou presença do NT157 e OSI-906 submetidas ao ensaio de *Western Blotting*. NT157 e OSI-906 reduziram a fosforilação de Igf1r e Stat3. OSI-906 reduziu a fosforilação de Erk1/2 e Akt1/2/3. NT157 aumentou a fosforilação de Akt e Erk e reduziu a fosforilação de Stat5 (Figura 14).

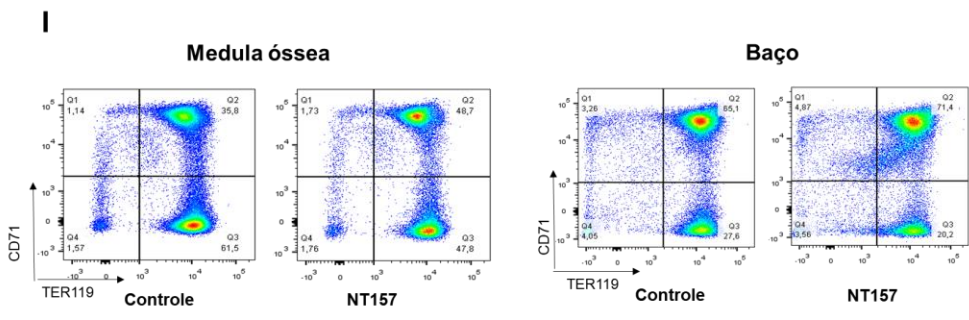
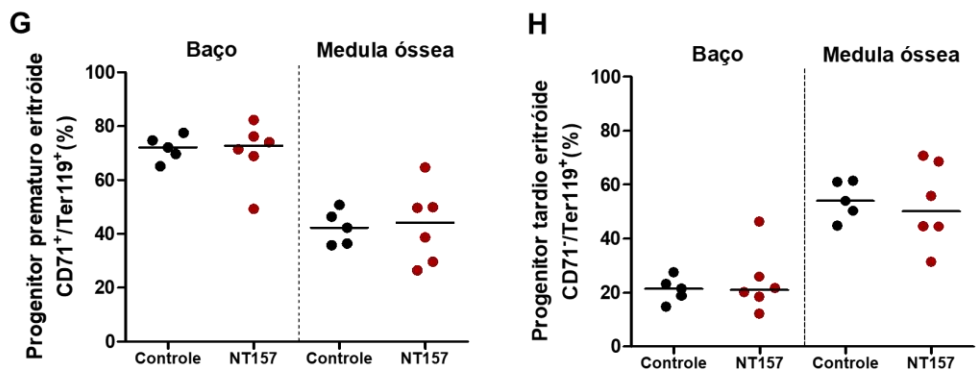
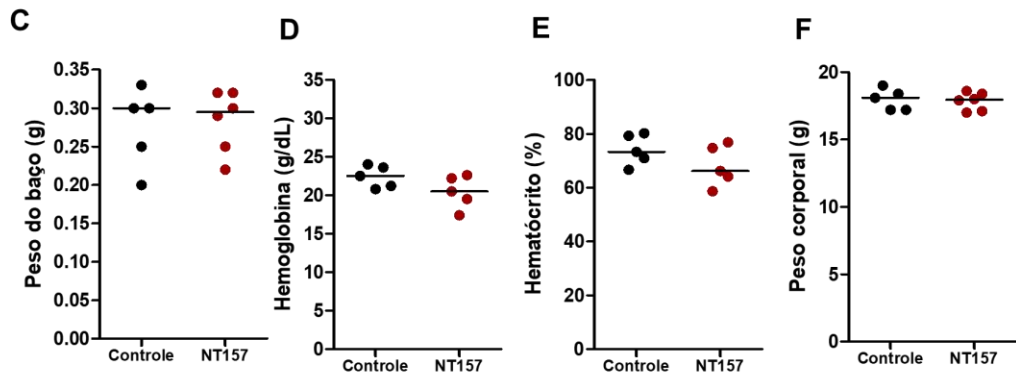
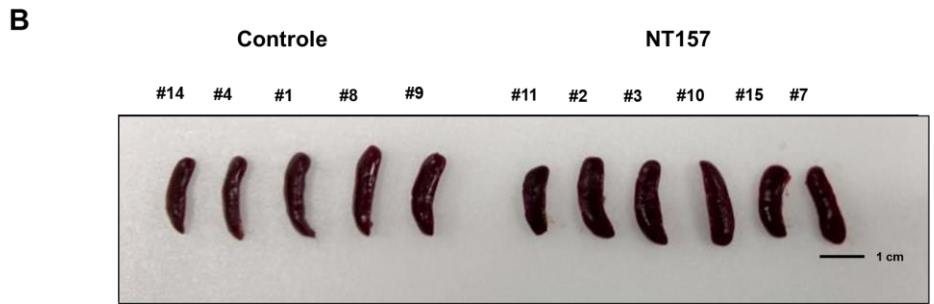
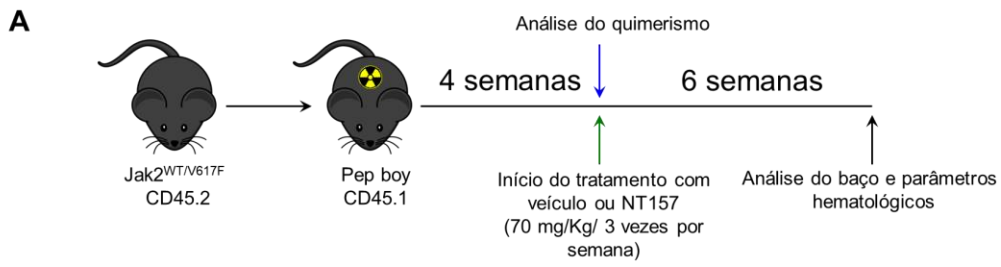


**Figura 14.** O tratamento com OSI-906 e NT157 *in vitro* modula vias de sinalização em células da medula óssea de camundongos expressando a forma mutada (V617F) da proteína JAK2. Análise de *Western blotting* para Igf1r<sup>Y1280</sup>, Igf1r, p-Stat3<sup>Y705</sup>, Stat3, p-Stat5<sup>Y705</sup>, Stat5, p-Akt1/2/3<sup>S473</sup>, Akt1/2/3, p-Erk1/2<sup>T183/Y185</sup> e Erk1/2 em células da medula óssea de camundongo JAK2<sup>V617F</sup> tratado *in vitro* com as concentrações indicadas de OSI-906 e NT157 durante 24 horas. As membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos para detectar proteína total ou fosforilada e reveladas com o sistema de Substrato de Duração Estendida Dura Dura SuperSignal™ West, utilizando um sistema de imagem Gel Doc XR+.



### **4.3. O tratamento com o inibidor NT157, in vivo, não modulou os parâmetros hematimétricos e o tamanho do baço do modelo murino de NMP JAK2<sup>V617F</sup> knockin**

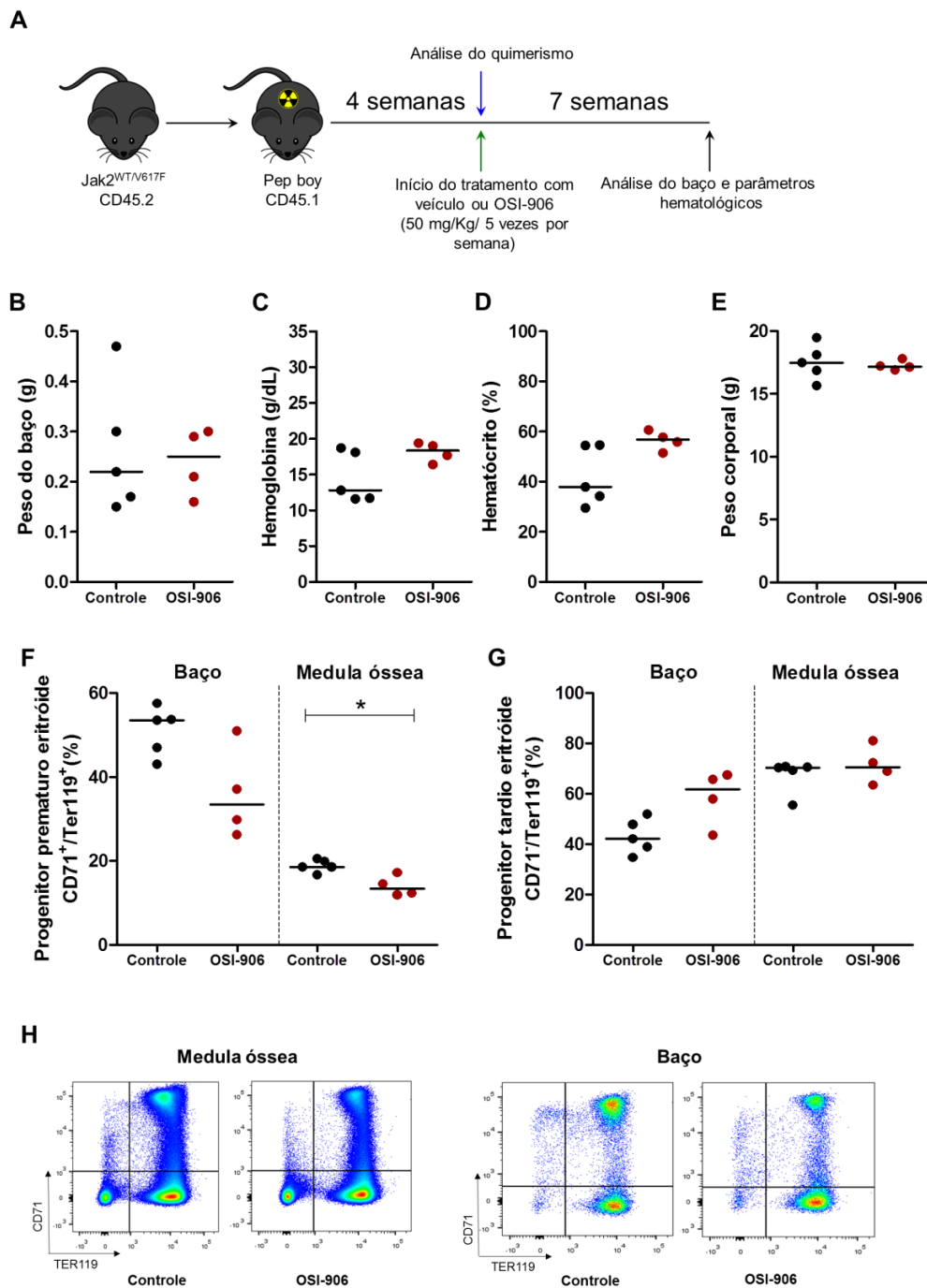
Realizamos o transplante utilizando o modelo murino com expressão condicionada da mutação JAK2<sup>V617F</sup>, para avaliação do efeito do tratamento do inibidor farmacológico da via IGF1R/IRS (NT157) nesse modelo. Encontramos mais de 70% de células CD45.2 do camundongo doador no sangue periférico dos camundongos receptores CD45.1 (quimerismo). Além disso, a análise do sangue periférico revelou um aumento na porcentagem de hemoglobina e hematócrito nos camundongos transplantados em relação ao controle, o que confirma o fenótipo de policitemia vera esperado para esses camundongos. A análise do sangue periférico não revelou nenhuma diferença significativa na porcentagem de hemoglobina e hematócrito entre os camundongos tratados com NT157 (n=6) e grupo controle (n=5) (**Figura 15D-E**). Nenhuma diferença significativa foi encontrada no peso corporal, peso do baço e na análise por citometria dos progenitores prematuros e tardios da medula óssea e baço entre o grupo tratado com NT157 e veículo (**Figura 15C-F e G-H**).



**Figura 15. NT157 em modelo murino de NMP JAK2<sup>V617F</sup> knockin.** Estudo experimental para indução de fenótipo de NMP em camundongo. Células da medula óssea de camundongos Jak2<sup>V617F</sup> foram transplantadas em camundongos Pep boy irradiados. Após a avaliação do quimerismo na quarta semana, os camundongos foram randomizados e tratados em dias alternados com veículo ou NT157 (70 mg/kg) por 6 semanas (A). Imagens dos baços dos camundongos tratados e grupo controle (B). Gráficos de dispersão mostrando o peso do baço (C), níveis de hemoglobina (D) e hematócrito (E), peso corporal (F), porcentagem de progenitores eritroides prematuros no baço e medula óssea (G), porcentagem de progenitores eritroides tardios no baço e medula óssea de camundongos tratados com NT157 e grupo controle (H). *Dot plot* ilustrativo dos progenitores da medula óssea e baço (I).

#### **4.4. O tratamento com o inibidor OSI-906, in vivo, reduziu progenitores eritróides e aumentou os progenitores mielóides do modelo murino de NMP JAK2<sup>V617F</sup> knockin**

Realizamos o transplante utilizando o modelo murino com expressão condicionada da mutação JAK2<sup>V617F</sup>, para avaliação do efeito do tratamento do inibidor farmacológico da via IGF1R/IR (OSI-906) nesse modelo. O sucesso do transplante foi observado por meio da quantificação das células do camundongo doador (CD45.2) no sangue do camundongo receptor, após o transplante, utilizando citometria de fluxo. Encontramos mais de 70% de células CD45.2 do camundongo doador no sangue periférico dos camundongos receptores CD45.1 (quimerismo). Além disso, a análise do sangue periférico revelou um aumento na porcentagem de hemoglobina e hematócrito nos camundongos transplantados em relação ao controle, o que confirma o fenótipo de policitemia vera esperado para esses camundongos. O tratamento com OSI-906 (50 mg/kg) *in vivo* foi bem tolerado pelos camundongos JAK2<sup>V617F</sup>, mas não reduziu o volume do baço (**Figura 16B**). OSI-906 reduziu significativamente os progenitores eritroides em células da medula óssea de camundongos JAK2<sup>V617F</sup> quando comparado com o veículo (**Figura 16F**). O número de hemoglobina e hematócrito não foi modulado pelo tratamento com OSI-906 (**Figura 16C-D**).



**Figura 16. OSI-906 em modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup>.** Estudo experimental para indução de fenótipo de NMP em camundongo. Células da medula óssea de camundongos JAK2<sup>V617F</sup> foram transplantadas em camundongos *Pep boy* irradiados. O tratamento com OSI-906 (50 mg/kg) ou veículo (25 mM de ácido tartárico), ambos administrados via oral por gavagem 1 vez ao dia, teve início após a avaliação do quimerismo e foi feito por 5 dias consecutivos seguido de pausa por 2 dias com duração final de 7 semanas (A). Gráficos de dispersão mostrando o peso do baço (B), níveis de hemoglobina (C) e hematócrito (D), peso corporal (E), porcentagem de progenitor prematuro eritróide no baço e medula óssea (F), porcentagem de progenitores eritroides tardio no baço e medula óssea de camundongos tratados com OSI-906 e grupo controle (G). Dot plot ilustrativo dos progenitores da medula óssea e baço (H). OSI-906 reduziu significativamente os progenitores eritroides em células da medula óssea de camundongos JAK2<sup>V617F</sup>. (Teste de *Mann-Whitney*; \* $p=0.03$ ).

OSI-906 aumentou significativamente os progenitores mielóides em células da medula óssea de camundongos  $JAK2^{V617F}$  quando comparado com o veículo (**Figura 17A**). OSI-906 não modulou o número de progenitores multipotentes ( $CD48^+/CD150^-$ ) e células-tronco hematopoiéticas de curto (CTH-CP) ( $CD48^-/CD150^-$ ) e longo prazo (CTH-LP) ( $CD48^-/CD150^+$ ) (**Figura 17D-F**).

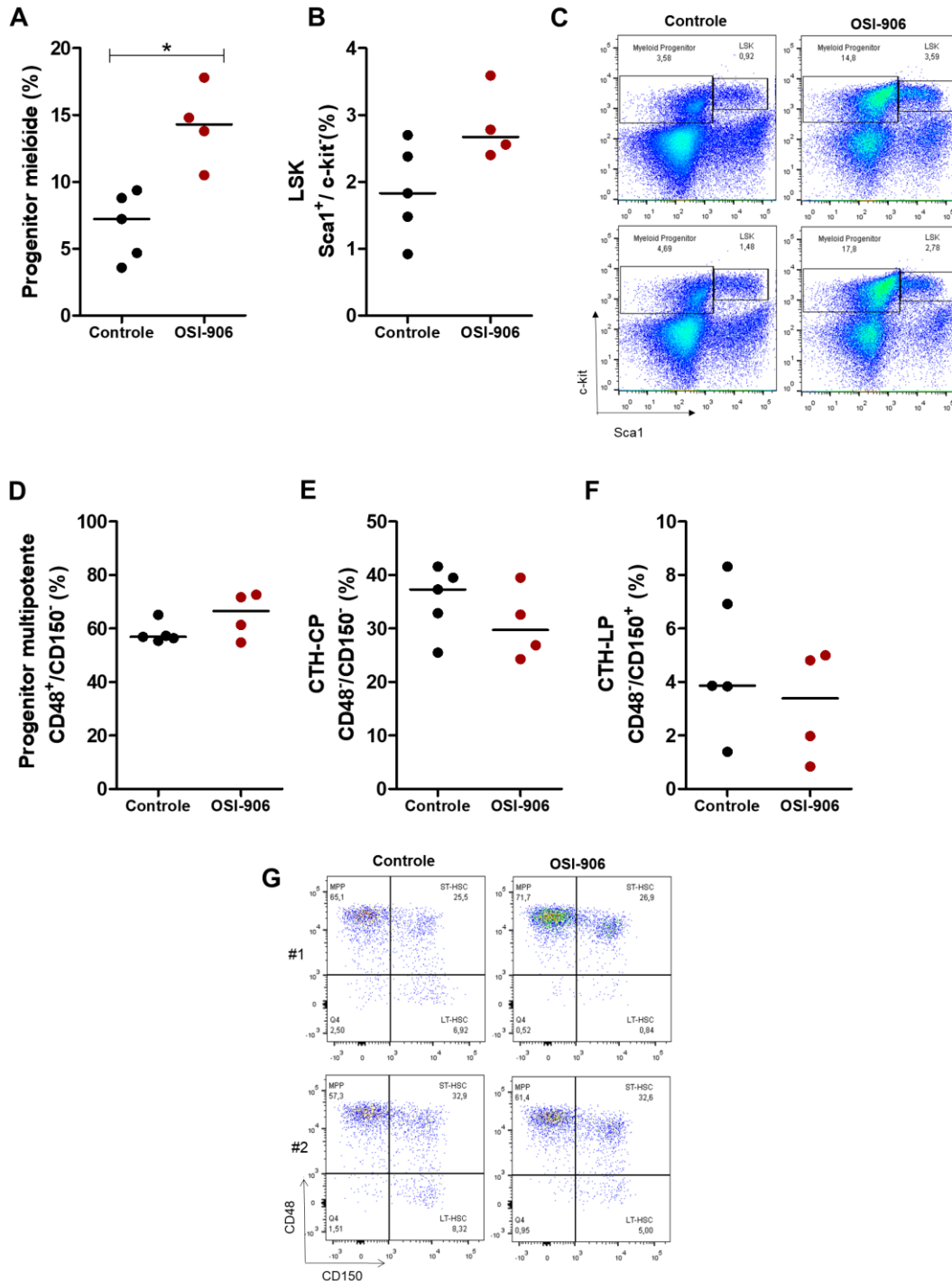
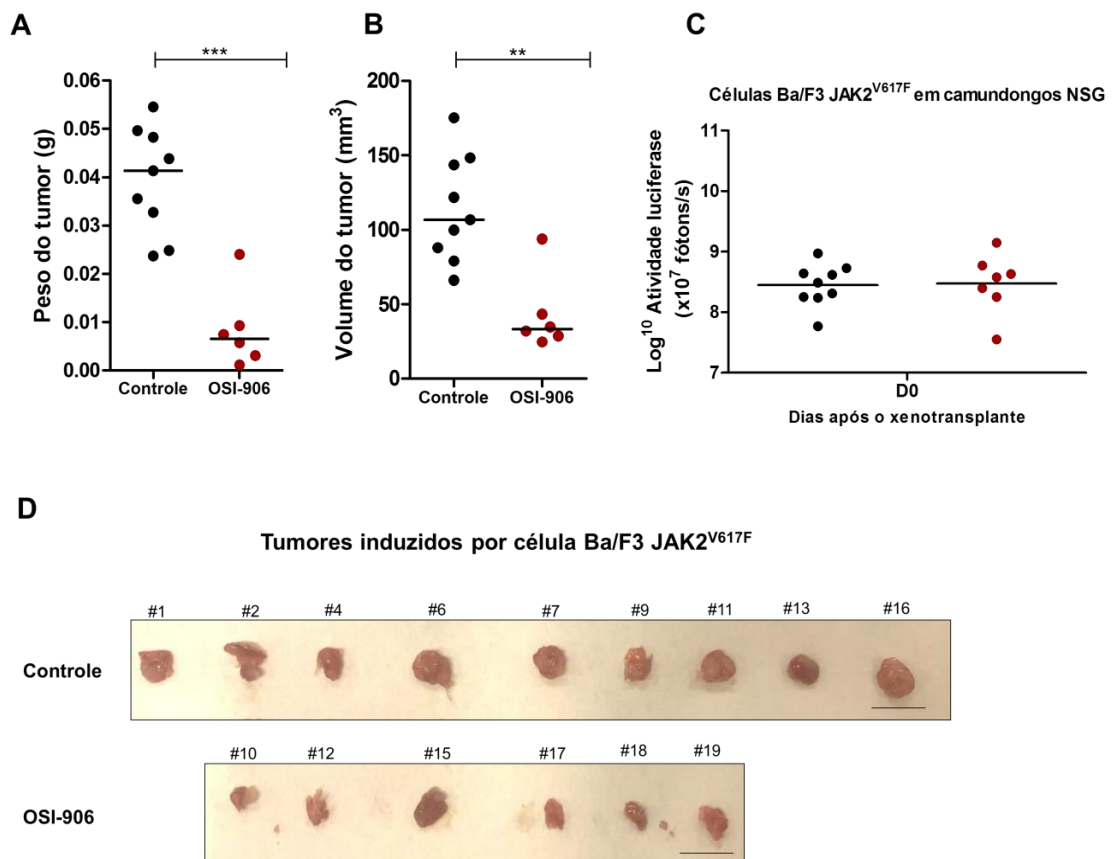


Figura 17. Efeito do tratamento com OSI-906 nos progenitores em modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup>. Gráficos de dispersão mostrando a percentagem de progenitores mielóides (A) e células LSK (B) em camundongos JAK2<sup>V617F</sup> tratados com OSI-906 ou controle. *Dot plot* ilustrativo dos progenitores mielóides da medula óssea (C). Note-se que o OSI-906 aumentou significativamente os progenitores mielóides em células da medula óssea dos camundongos JAK2<sup>V617F</sup>. Gráficos de dispersão mostrando a percentagem de progenitores multipotentes (D), células-tronco hematopoiéticas de curto (E) e longo prazo (F) camundongos JAK2<sup>V617F</sup> tratados com OSI-906 ou controle. *Dot plot* ilustrativo dos progenitores e células-tronco da medula óssea (G). teste de *Mann-Whitney*; \**p* = 0,01)

#### 4.5. OSI-906 reduz o crescimento tumoral induzido por células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>

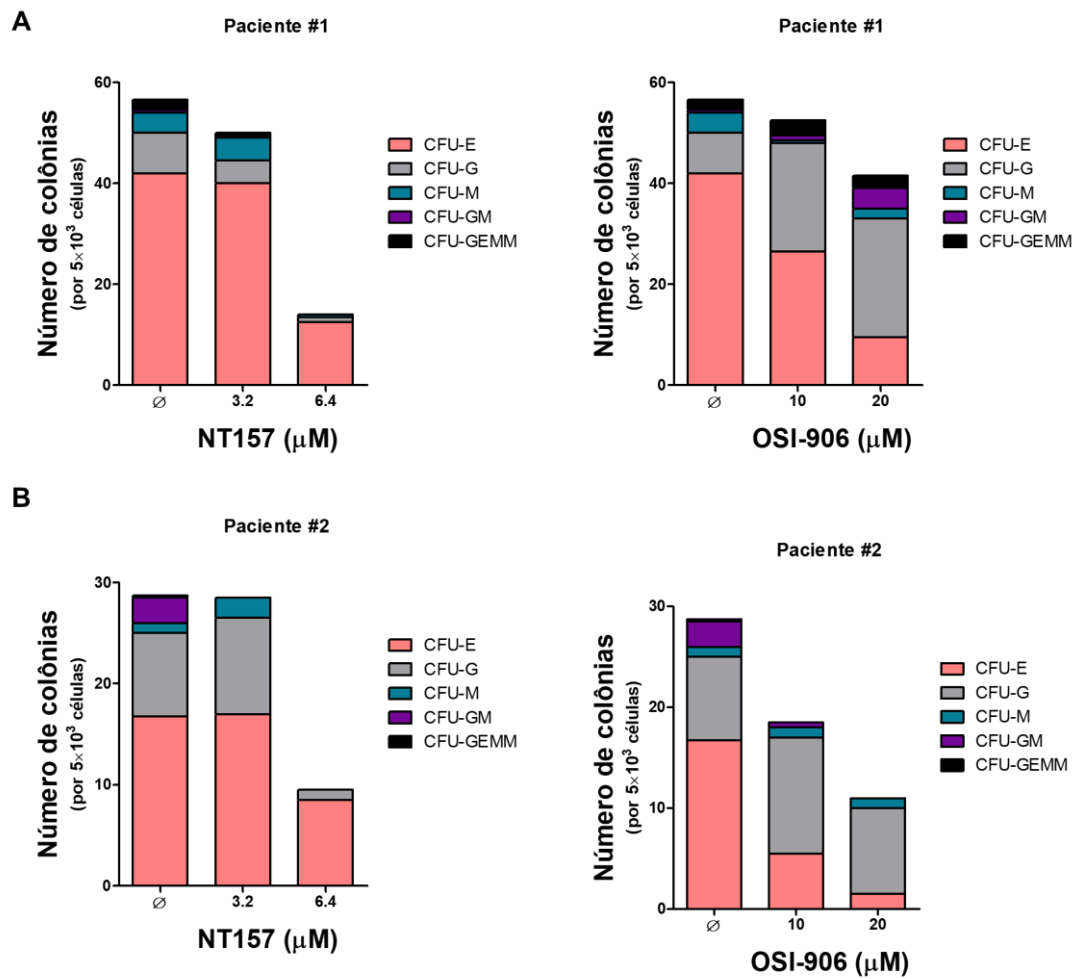
Nosso próximo passo foi avaliar o efeito do tratamento com OSI-906 na formação de tumor de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> *in vivo*. Como não encontramos o resultado esperado com o camundongo *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup>, decidimos utilizar uma dose maior de OSI-906 (70 mg/kg) para o tratamento desse novo modelo. O tratamento com OSI-906 foi capaz de reduzir o crescimento tumoral induzido por células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, porém o mesmo apresentou uma toxicidade e o experimento teve que ser finalizado antes do tempo (**Figura 18**).



**Figura 18. OSI-906 reduz o crescimento tumoral em modelo de tumorigênese induzido por células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>.** Imagens e volumes de tumores induzidos por injeção subcutânea de células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> em camundongos NSG, tratados com veículo (25 mM de ácido tartárico) (n=9) ou OSI-906 (70 mg/kg) (n=7). (A) Gráfico de dispersão mostrando o peso dos tumores. (B) O volume do tumor (V) foi calculado usando a fórmula ( $V = W^2 \times L \times 0,52$ ), onde W e L representam os menores e maiores diâmetros, respectivamente. (C) Gráfico comparando os valores de quimioluminescência entre os dois grupos de animais. Os animais foram randomizados em grupo tratado e controle a partir desse resultado. (D) Imagens individuais de tumores dos animais são mostradas; teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Barra de escala: 10 mm.

#### 4.6. O tratamento com os inibidores seletivos de IGF1R/IRS (NT157) e IGF1R/IR (OSI-906) reduziu o crescimento clonal de células de pacientes com mielofibrose primária

Para investigar o efeito de OSI-906 e NT157 sobre células hematopóéticas de pacientes com mielofibrose primária, células mononucleares da medula óssea foram submetidos ao ensaio de formação de colônia na presença de veículo ou OSI-906/NT157. O tratamento com OSI-906 e NT157 *in vitro* reduziu a formação de colônia em amostras de pacientes com mielofibrose primária (**Figura 19**).



**Figura 19.** O tratamento com OSI-906 e NT157 *in vitro* reduz a formação de colônias em células do sangue periférico de pacientes com mielofibrose primária. Células foram isoladas e plaqueadas em metilcelulose enriquecida com citocinas e incubadas por 14 dias com as concentrações indicadas de OSI-906 e NT157. Os resultados indicam o número de colônias formadas a partir de células progenitoras e diferenciadas em colônias eritrocíticas (CFU-E), granulocíticas (CFU-G), megacariocíticas (CFU-M), grânulo-monocíticas (CFU-GM) e multi-linhagem (CFU-GEMM). (A) paciente #1 (B) paciente #2



# ***DISCUSSÃO***

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizamos a avaliação dos inibidores de IGF1R/IRS (NT157) e de IGF1R/IR (OSI-906 e NVP-AEW54) em linhagens celulares JAK2 mutada (BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>) e selvagem (BAF3 JAK2<sup>WT</sup>) e em modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup>. O tratamento com NT157 foi capaz de inibir a via de sinalização do IRS1/2, a fosforilação de JAK2 e de STAT3/5 e resultou em atividade antineoplásica notável, incluindo diminuição na viabilidade celular e proliferação, acompanhada pela indução de apoptose em células BAF3 JAK2 mutada e selvagem. Além disso, o tratamento com NT157 resultou no aumento da fosforilação de ERK1/2. Reuveni e colegas <sup>94</sup> encontraram o mesmo aumento da ativação de ERK/MAPK após exposição a este composto, e descreveram que a degradação de IRS1/2 é mediada por essa via. A inibição de STAT3 após o tratamento com NT157 também foi descrita em outras linhagens de células tumorais sólidas, incluindo câncer de próstata, câncer de mama, melanoma, mieloma múltiplo e câncer colorretal <sup>95; 106</sup>. Flashner-Abramson e colegas <sup>95</sup> descreveram que a inibição de STAT3 é um mecanismo independente de ação do NT157 no eixo IGF1R/IRS.

Nós observamos que o tratamento com NT157 apresenta a vantagem de modular a fosforilação não apenas de STAT3, mas também de STAT5, que é um membro de uma família de fatores de transcrição que parece estar mais relacionado à expansão mieloide induzida por JAK2<sup>V617F</sup> <sup>107</sup>. Em células Ba/F3, foi demonstrado que a ativação constitutiva de STAT5 é necessária para a transformação neoplásica mediada por JAK2<sup>V617F</sup> <sup>108</sup>. Corroborando com esses achados, Yan e colaboradores <sup>109</sup> demonstraram *in vivo* que o STAT5 é necessário e desempenha um papel crítico no desenvolvimento da policitemia vera em um modelo murino de NMP. Em linhagens celulares de neoplasia mieloproliferativa JAK2<sup>V617F</sup>, HEL e SET2, o tratamento com NT157 diminuiu significativamente a viabilidade celular, clonogenicidade e proliferação celular, enquanto resultou em aumento da apoptose e parada do ciclo celular em G2/M. Além disso, NT157 inibiu a fosforilação de STAT3, STAT5 e ERK <sup>98</sup>.

Para avaliação do inibidor de IGF1R/IR1/2 (NT157) *in vivo*, utilizamos o modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup>. O esquema de tratamento utilizado foi de 70mg/kg via intraperitoneal de NT157 três vezes por semana. Observamos que NT157 não modulou os parâmetros hematimétricos e o tamanho do baço nessa modelo. Todos os grupos de pesquisa que descreveram o tratamento com NT157 *in vivo*,

optaram por uma frequência de tratamento de três vezes por semana e doses entre 50 a 100 mg/kg. No entanto, estes testes foram realizados somente em tumores sólidos, com evolução clínica mais lenta<sup>94; 95; 96</sup>. Diante dessas considerações, adequações podem ser necessárias para se avaliar a eficácia do tratamento com NT157 *in vivo* em NMP.

OSI-906 é um inibidor altamente seletivo para os receptores tirosinoquinase, IGF1R e IR, com efeito antiproliferativo em uma variedade de linhagens celulares de tumores sólidos, e efeito antitumoral em modelo xenográfico<sup>89; 90</sup>. Além disso, estudos clínicos demonstraram a atividade antitumoral de OSI-906 em pacientes com melanoma e carcinoma adrenocortical<sup>91; 92; 93</sup>. No presente estudo, OSI-906 foi capaz de reduzir a viabilidade celular, a proliferação e induzir a apoptose apenas na dose mais alta utilizada. Resultado semelhante foi encontrado por Rodrigues Alves estudando linhagens celulares de leucemia linfóide aguda (LLA)<sup>110</sup>. O tratamento com OSI-906 inibiu a via de sinalização do IRS1/2, a fosforilação de JAK2, STAT3/5 e ERK.

Para avaliação do inibidor de IGF1R/IR (OSI-906) *ex vivo* e *in vivo*, utilizamos o modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup> e o modelo de tumorigênese induzido por célula Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. O tratamento, *ex vivo*, com inibidor de IGF1R/IR (OSI-906) foi capaz de inibir a formação de colônia e a fosforilação de IGF1R, STAT3, ERK1/2 e AKT1/2/3 em células da medula óssea do camundongo JAK2<sup>V617F</sup>.

A relação entre a via do IGF1R/IR e a mutação JAK2<sup>V617F</sup> também foi encontrada por Staerk e colaboradores, que demonstraram que a expressão do mutante JAK2<sup>V617F</sup> torna as células Ba/F3 hipersensíveis ao IGF1, o qual ativa STAT5, STAT3, ERK1/2 e AKT<sup>81</sup>. Mais recentemente, Osorio e colaboradores demonstraram que o silenciamento de IGF1R, em linhagens celulares de neoplasia mieloproliferativa JAK2<sup>V617F</sup>, SET2 e HEL, é capaz de provocar parada no crescimento celular e repressão de um conjunto de genes associados à via JAK2/STAT<sup>77</sup>.

O tratamento com OSI-906 no modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup> levou a uma redução dos progenitores hematopoéticos eritroides da medula óssea, mas não modulou o tamanho do baço nesses animais. A via de administração e a dose escolhida de OSI-906 (50 mg/kg; gavagem) se baseou em artigos da literatura que utilizaram OSI-906 para o tratamento em tumores sólidos, como melanoma<sup>111</sup>, ovário<sup>112</sup>, colorretal<sup>104</sup>, pulmão<sup>113</sup> e mama<sup>114</sup>; entretanto, o esquema de tratamento utilizado em trabalhos já publicados foi de gavagem diária durante o tempo máximo de 15 dias. Uma vez que a via de administração do OSI-906 precisa ser a via oral, optamos por realizar um esquema de tratamento de 5 dias seguido de pausa de 2 dias para reduzir possíveis efeitos adversos provocadas pelo procedimento da

gavagem aos animais. A dose de 50 mg/kg foi bem tolerada pelos animais, com nenhuma perda de peso significativa, entretanto, o tratamento não apresentou o resultado esperado, como a redução do tamanho do baço e alteração na célula-tronco, o que pode ser justificado devido à dose e o esquema de tratamento utilizado. Devido à robustez do experimento os resultados negativos encontrados, decidimos não repetir o modelo. Sendo assim, partimos para o modelo de tumorigênese induzido por células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, o qual já foi padronizado por nosso grupo de pesquisa e é uma modelo de tratamento mais curto (15 dias), que teria chance de apresentar resultados mais satisfatórios. Decidimos aumentar a dose de OSI-906 (70 mg/kg/dia, via gavagem, todos os dias) com base em trabalho da literatura que mostrou ser uma dose tolerável <sup>90</sup>. O tratamento com OSI-906 70 mg/kg/dia provocou redução significativa no peso e volume dos tumores tratados com OSI-906 em relação aos animais tratados apenas com veículo. Entretanto, o regime de tratamento provocou uma perda de mais de 10% do peso corporal dos animais, o que levou ao fim precoce do experimento, com apenas 7 dias. O ajuste da dose, do regime de tratamento, e a investigação de possíveis associações de drogas, são necessários para que possamos observar melhores resultados e uma menor toxicidade em ambos os modelos murinos de NMP. Recente trabalho demonstrou que OSI-906 na dose de 25mg/kg foi capaz de aumentar a sobrevivência de um modelo murino *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup>, porém a dose e o modelo utilizado foi diferente do nosso <sup>115</sup>.

O inibidor tirosinoquinase NVP-AEW54 reduziu a viabilidade celular e aumentou a apoptose a partir da menor dose utilizada em todos os tempos de tratamento, e foi capaz de reduzir a ativação da via do IGF1R/IRS, PI3K/AKT/mTOR, JAK2 e STAT5, mas não modulou ERK1/2. Osorio e colaboradores pontuaram o efeito benéfico do inibidor farmacológico de IGF1R (NVP-AEW54) em NMP. Utilizando um modelo murino de TE JAK2<sup>V617F</sup>, demonstraram que o tratamento com NVP-AEW541 melhorou o fenótipo de NMP dos animais. Entretanto, Chapius et al <sup>87</sup> observaram anteriormente que NVP-AEW541 é capaz de inibir a sinalização induzida não apenas pelo IGF1, mas também a sinalização induzida por FLT3L e SCF em células de LMA, indicando a falta de especificidade do inibidor.

Tendo em vista que os inibidores farmacológicos de IGF1R/IRS tiveram diferente toxicidade em células BA/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, sendo o inibidor OSI-906 o que apresentou resultado mais limitante, foi necessário investigar o que poderia explicar esse resultado. Nós demonstramos que OSI-906 induz autofagia em células BA/F3 JAK2<sup>V617F</sup>. Nosso grupo de pesquisa já tinha demonstrado que ruxolitinibe induz autofagia em células JAK2<sup>V617F</sup> e que o uso de inibidores da autofagia é capaz de aumentar a apoptose induzida por ruxolitinibe <sup>116</sup>. A

ativação da autofagia pelo OSI-906 pode explicar os resultados inexpressivos de OSI-906 na indução da apoptose e proliferação em células JAK2<sup>V617F</sup>.

NT157 e OSI-906 inibiram a formação de colônias de pacientes com mielofibrose primária. NT157 também reduziu a formação espontânea de colônias eritroides em células primárias de pacientes com PV<sup>98</sup> e pacientes com leucemia mieloide crônica<sup>117</sup>.

Inibidores farmacológicos da via IGF1R-IRS1/2 apresentaram efeitos antineoplásicos em modelos de NMP JAK2<sup>V617F</sup>, porém os efeitos observados nos ensaios *in vitro* variam a depender da dose de cada inibidor, e os efeitos distintos observados nos ensaios *in vitro* e *in vivo* reforçam a dificuldade em se obter inibidores farmacológicos eficazes e seguros na prática clínica. NVP-AEW54 apresentou efeitos notáveis na linhagem celular BA/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, porém o mesmo é conhecido por ser pouco específico e não é utilizado na prática clínica até o momento desse trabalho. NT157 também apresentou efeitos antineoplásicos na linhagem celular BA/F3 JAK2<sup>V617F</sup>, porém no modelo *in vivo* não foi observado nenhum efeito da droga, indicando que mais estudos são necessários afim de se entender a farmacocinética da droga e a melhor dose e via de administração para uso *in vivo*. OSI-906 reduziu o volume do tumor no modelo murino de NMP induzido por células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>, mas não foi bem tolerado pelos animais, indicando que o tratamento tem efeito antineoplásico em doses tóxicas, fator limitante para o uso em humanos. A identificação da indução da autofagia pelo OSI-906 como mecanismo de resistência à apoptose, sugere que a combinação de OSI-906 com drogas inibidoras da autofagia, como a cloroquina<sup>116</sup>, pode ser uma opção viável, eficaz e segura para estudos futuros com potencial translacional em NMP JAK2<sup>V617F</sup>.

# ***CONCLUSÃO***

## 6. CONCLUSÃO

- Em células Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup> sem adição de meio condicionado WEHI-3B, que é um modelo de neoplasia induzido pela ativação da mutação JAK2<sup>V617F</sup>, NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 inibiram a viabilidade, a proliferação e aumentaram a apoptose. Entretanto, OSI-906 aumentou a apoptose apenas em altas doses, e a indução da autofagia pelo OSI-906 foi identificada como mecanismo de resistência à apoptose. NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 reduziram a fosforilação/ativação da via IGF1R/IRS e JAK/STAT. NT157 aumentou a fosforilação de Erk e não modulou Akt;
- Em células Ba/F3 JAK2<sup>WT</sup>, com adição de meio condicionado WEHI-3B, que representa um modelo de ativação da via JAK/STAT de maneira independente da mutação JAK2<sup>V617F</sup>, NT157, OSI-906 e NVP-AEW54 inibiram a viabilidade, a proliferação e aumentaram a apoptose de maneira semelhante a célula Ba/F3 JAK2<sup>V617F</sup>.
- Em células primárias de camundongo *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup>, os tratamentos com OSI-906 e NT157 reduziram a viabilidade, inibiram a via de sinalização IGF1R/IRS e STAT3 e a formação de colônias *ex vivo*;
- Em modelo murino de NMP *knockin* para JAK2<sup>V617F</sup>, o tratamento com OSI-906 50mg/kg/dia, via oral, 5 dias por semana, por 7 semanas, resultou em redução dos progenitores hematopoéticos eritroides e aumento dos progenitores mieloides da medula óssea. O tratamento com NT157 no mesmo modelo não modulou os parâmetros hematimétricos e o tamanho do baço;
- Em modelo murino de NMP induzido por células BAF3 JAK2<sup>V617F</sup>, o tratamento com OSI-906 70mg/kg/dia, via oral, todos os dias, por 7 dias, resultou em redução do volume do tumor associado à toxicidade sistêmica;
- Em células hematopoéticas primárias de pacientes com mielofibrose JAK2<sup>V617F</sup>, os tratamentos com OSI-906 e NT157 reduziram a formação de colônia.

# ***REFERÊNCIAS***



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1      TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 14-22, Jan 2008. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882280> >.
- 2      ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 2016. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254> >.
- 3      SATTLER, M.; GRIFFIN, J. D. Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. **Int J Hematol**, v. 73, n. 3, p. 278-91, Apr 2001. ISSN 0925-5710. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11345193> >.
- 4      LANDOLFI, R.; CIPRIANI, M. C.; NOVARESE, L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanisms and prevention. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 19, n. 3, p. 617-33, 2006. ISSN 1521-6926. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781491> >.
- 5      MARCHIOLI, R. et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 10, p. 2224-32, Apr 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710945> >.
- 6      SPIVAK, J. L. et al. Two clinical phenotypes in polycythemia vera. **N Engl J Med**, v. 371, n. 9, p. 808-17, Aug 2014. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25162887> >.
- 7      SPIVAK, J. L. Myeloproliferative Neoplasms. **N Engl J Med**, v. 377, n. 9, p. 895-6, 08 2017. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28854086> >.
- 8      TEFFERI, A. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 16, p. 2507-13; quiz 2615, Oct 2014. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037629> >.
- 9      VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 667-679, 02 2017. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28028029> >.
- 10     BARBUI, T. et al. Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. **Blood Cancer J**, v. 5, p. e369, Nov 2015. ISSN 2044-5385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617062> >.

- 11 PARNES, A.; RAVI, A. Polycythemia and Thrombocytosis. **Prim Care**, v. 43, n. 4, p. 589-605, Dec 2016. ISSN 1558-299X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27866579> >.
- 12 TEFFERI, A.; BARBUI, T. Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera: Focus on Clinical Practice. **Mayo Clin Proc**, v. 90, n. 9, p. 1283-93, Sep 2015. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355403> >.
- 13 SAVONA, M. R. Are we altering the natural history of primary myelofibrosis? **Leuk Res**, v. 38, n. 9, p. 1004-12, Sep 2014. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931396> >.
- 14 MITRA, D. et al. Symptom burden and splenomegaly in patients with myelofibrosis in the United States: a retrospective medical record review. **Cancer Med**, v. 2, n. 6, p. 889-98, Dec 2013. ISSN 2045-7634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403262> >.
- 15 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, Apr 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858187> >.
- 16 VAINCHENKER, W. et al. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1723-35, Aug 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653328> >.
- 17 LEONARD, W. J.; O'SHEA, J. J. Jaks and STATs: biological implications. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 293-322, 1998. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597132> >.
- 18 WINSTON, L. A.; HUNTER, T. JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. **J Biol Chem**, v. 270, n. 52, p. 30837-40, Dec 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8537333> >.
- 19 AL-SHAMI, A.; NACCACHE, P. H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Involvement of Jak2 in the stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem**, v. 274, n. 9, p. 5333-8, Feb 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10026141> >.
- 20 PRATILAS, C. A.; SOLIT, D. B. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 13, p. 3329-34, Jul 2010. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472680> >.

- 21 LUNDBERG, P. et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. **J Exp Med**, v. 211, n. 11, p. 2213-30, Oct 2014. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288396> >.
- 22 RAMPAL, R.; LEVINE, R. L. A primer on genomic and epigenomic alterations in the myeloproliferative neoplasms. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 27, n. 2, p. 83-93, Jun 2014. ISSN 1532-1924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189720> >.
- 23 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, Sep 2007. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721432> >.
- 24 ANAND, S. et al. Increased basal intracellular signaling patterns do not correlate with JAK2 genotype in human myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 6, p. 1610-21, Aug 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653937> >.
- 25 KAMISHIMOTO, J. et al. Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. **Cell Signal**, v. 23, n. 5, p. 849-56, May 2011. ISSN 1873-3913. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255641> >.
- 26 PARDANANI, A. D. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3472-6, Nov 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16868251> >.
- 27 GIBSON, S. E. et al. Phospho-STAT5 expression pattern with the MPL W515L mutation is similar to that seen in chronic myeloproliferative disorders with JAK2 V617F. **Hum Pathol**, v. 39, n. 7, p. 1111-4, Jul 2008. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479730> >.
- 28 KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med**, v. 369, n. 25, p. 2379-90, Dec 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325356> >.
- 29 NANGALIA, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. **N Engl J Med**, v. 369, n. 25, p. 2391-405, Dec 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325359> >.
- 30 ELF, S. et al. Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. **Cancer Discov**, v. 6, n. 4, p. 368-81, Apr 2016. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951227> >.

- 31 NANGALIA, J.; GREEN, T. R. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2014, n. 1, p. 287-96, Dec 2014. ISSN 1520-4383. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25696868> >.
- 32 YARBRO, J. W. Mechanism of action of hydroxyurea. **Semin Oncol**, v. 19, n. 3 Suppl 9, p. 1-10, Jun 1992. ISSN 0093-7754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1641648> >.
- 33 ALVAREZ-LARRÁN, A. et al. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. **Br J Haematol**, v. 146, n. 5, p. 504-9, Sep 2009. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604233> >.
- 34 MASSARO, P. et al. Polycythemia vera treated with recombinant interferon-alpha 2a: evidence of a selective effect on the malignant clone. **Am J Hematol**, v. 56, n. 2, p. 126-8, Oct 1997. ISSN 0361-8609. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326356> >.
- 35 CHESON, B. D.; RUMMEL, M. J. Bendamustine: rebirth of an old drug. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 9, p. 1492-501, Mar 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224851> >.
- 36 SHVIDEL, L. et al. Busulphan is safe and efficient treatment in elderly patients with essential thrombocythemia. **Leukemia**, v. 21, n. 9, p. 2071-2, Sep 2007. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611572> >.
- 37 RAEDLER, L. A. Jakafi (Ruxolitinib): First FDA-Approved Medication for the Treatment of Patients with Polycythemia Vera. **Am Health Drug Benefits**, v. 8, n. Spec Feature, p. 75-9, Mar 2015. ISSN 1942-2962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629270> >.
- 38 GADINA, M. et al. Translational and clinical advances in JAK-STAT biology: The present and future of jakinibs. **J Leukoc Biol**, v. 104, n. 3, p. 499-514, 09 2018. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29999544> >.
- 39 PARDANANI, A. et al. JAK inhibitor therapy for myelofibrosis: critical assessment of value and limitations. **Leukemia**, v. 25, n. 2, p. 218-25, Feb 2011. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079613> >.
- 40 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, Mar 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22375970> >.
- 41 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, Mar 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22375971> >.

- 42 \_\_\_\_\_ . A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 Inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. **Cancer**, v. 120, n. 4, p. 513-20, Feb 2014. ISSN 1097-0142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24258498> >.
- 43 BLUM, S.; MARTINS, F.; ALBERIO, L. Ruxolitinib in the treatment of polycythemia vera: patient selection and special considerations. **J Blood Med**, v. 7, p. 205-215, 2016. ISSN 1179-2736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27729820> >.
- 44 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, Sep 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843246> >.
- 45 HARRISON, C. N. et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. **Leukemia**, v. 30, n. 8, p. 1701-7, Aug 2016. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27211272> >.
- 46 MULLALLY, A. et al. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. **Cancer Cell**, v. 17, n. 6, p. 584-96, Jun 2010. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541703> >.
- 47 ANNUNZIATA, M.; GRANATA, R.; GHIGO, E. The IGF system. **Acta Diabetol**, v. 48, n. 1, p. 1-9, Mar 2011. ISSN 1432-5233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042815> >.
- 48 MAURO, L.; SURMACZ, E. IGF-I receptor, cell-cell adhesion, tumour development and progression. **J Mol Histol**, v. 35, n. 3, p. 247-53, Mar 2004. ISSN 1567-2379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339044> >.
- 49 SECCARECCIA, E.; BRODT, P. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. **Growth Horm IGF Res**, v. 22, n. 6, p. 193-9, Dec 2012. ISSN 1532-2238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23098677> >.
- 50 MYERS, M. G., JR. et al. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. **Endocrinology**, v. 132, n. 4, p. 1421-30, Apr 1993. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384986> >.
- 51 MARDILOVICH, K.; PANKRATZ, S. L.; SHAW, L. M. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. **Cell Commun Signal**, v. 7, p. 14, Jun 2009. ISSN 1478-811X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19534786> >.

- 52 RIDDERSTRÅLE, M.; DEGERMAN, E.; TORNQVIST, H. Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes. **J Biol Chem**, v. 270, n. 8, p. 3471-4, Feb 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876077> >.
- 53 CUI, X. et al. Progesterone crosstalks with insulin-like growth factor signaling in breast cancer cells via induction of insulin receptor substrate-2. **Oncogene**, v. 22, n. 44, p. 6937-41, Oct 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534541> >.
- 54 \_\_\_\_\_. Epidermal growth factor induces insulin receptor substrate-2 in breast cancer cells via c-Jun NH(2)-terminal kinase/activator protein-1 signaling to regulate cell migration. **Cancer Res**, v. 66, n. 10, p. 5304-13, May 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707456> >.
- 55 WHITE, M. F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. **Recent Prog Horm Res**, v. 53, p. 119-38, 1998. ISSN 0079-9963 (Print) 0079-9963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9769706> >.
- 56 VIRKAMAKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 103, n. 7, p. 931-43, Apr 1999. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10194465> >.
- 57 SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73-7, Jul 1991. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1648180> >.
- 58 CRISTOFANELLI, B. et al. Cooperative transformation of 32D cells by the combined expression of IRS-1 and V-Ha-Ras. **Oncogene**, v. 19, n. 29, p. 3245-55, Jul 6 2000. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10918581> >.
- 59 VALENTINIS, B. et al. Insulin receptor substrate-1, p70S6K, and cell size in transformation and differentiation of hemopoietic cells. **J Biol Chem**, v. 275, n. 33, p. 25451-9, Aug 18 2000. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846175> >.
- 60 DEANGELIS, T. et al. Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signaling. **Oncogene**, v. 25, n. 1, p. 32-42, Jan 5 2006. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170362> >.
- 61 DEARTH, R. K. et al. Mammary tumorigenesis and metastasis caused by overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) or IRS-2. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 24, p. 9302-14, Dec 2006.

- ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030631> >.
- 62 D'AMBROSIO, C. et al. Transforming potential of the insulin receptor substrate 1. **Cell Growth Differ**, v. 6, n. 5, p. 557-62, May 1995. ISSN 1044-9523. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7647039> >.
- 63 DEL RINCÓN, S. V. et al. Retinoic acid mediates degradation of IRS-1 by the ubiquitin-proteasome pathway, via a PKC-dependant mechanism. **Oncogene**, v. 23, n. 57, p. 9269-79, Dec 2004. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516986> >.
- 64 TRAINA, F. et al. BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells. **FEBS Lett**, v. 535, n. 1-3, p. 17-22, Jan 2003. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560071> >.
- 65 MACHADO-NETO, J. A. et al. Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 8, p. 1404-11, Aug 2011. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569802> >.
- 66 FERNANDES, J. C. et al. IRS1/ $\beta$ -Catenin Axis Is Activated and Induces MYC Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. **J Cell Biochem**, Dec 2016. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27987331> >.
- 67 YENUSH, L.; WHITE, M. F. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. **Bioessays**, v. 19, n. 6, p. 491-500, Jun 1997. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9204766> >.
- 68 PLATANIAS, L. C. et al. The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2. **J Biol Chem**, v. 271, n. 1, p. 278-82, Jan 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550573> >.
- 69 SAAD, M. J. et al. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J Biol Chem**, v. 271, n. 36, p. 22100-4, Sep 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703019> >.
- 70 SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A.; CARVALHO, C. R. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. **Biochem J**, v. 310 ( Pt 3), p. 741-4, Sep 1995. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7575404> >.
- 71 FOLLI, F. et al. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk.

- J Clin Invest**, v. 100, n. 9, p. 2158-69, Nov 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9410892> >.
- 72 VELLOSO, L. A. et al. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 22, n. 2, p. 98-107, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 1520-7552. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16389635> >.
- 73 \_\_\_\_\_. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 22, p. 12490-5, Oct 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901609> >.
- 74 CARVALHEIRA, J. B. et al. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. **Biol Chem**, v. 384, n. 1, p. 151-9, Jan 2003. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12674509> >.
- 75 DE MELO CAMPOS, P. et al. IRS2 silencing increases apoptosis and potentiates the effects of ruxolitinib in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. **Oncotarget**, v. 7, n. 6, p. 6948-59, Feb 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26755644> >.
- 76 SAVAGE, S. L. et al. **Activating Mutations of Insulin Receptor Substrate 2 (IRS2) in Patients with Tyrosine Kinase Inhibitor-Refractory Chronic Myeloid Leukemia**. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 126 (2015): Abstract #2461 2015.
- 77 OSORIO, F. G. et al. Loss of the proteostasis factor AIRAPL causes myeloid transformation by deregulating IGF-1 signaling. **Nat Med**, v. 22, n. 1, p. 91-6, Jan 2016. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26692333> >.
- 78 CORREA, P. N.; ESKINAZI, D.; AXELRAD, A. A. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. **Blood**, v. 83, n. 1, p. 99-112, Jan 1994. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274756> >.
- 79 MIRZA, A. M.; CORREA, P. N.; AXELRAD, A. A. Increased basal and induced tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor I receptor beta subunit in circulating mononuclear cells of patients with polycythemia vera. **Blood**, v. 86, n. 3, p. 877-82, Aug 1995. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542500> >.
- 80 MIRZA, A. M.; EZZAT, S.; AXELRAD, A. A. Insulin-like growth factor binding protein-1 is elevated in patients with polycythemia vera and stimulates erythroid burst formation in vitro. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1862-9, Mar 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058705> >.



- 81 STAERK, J. et al. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. **J Biol Chem**, v. 280, n. 51, p. 41893-9, Dec 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239216> >.
- 82 GUAL, P. et al. Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 884-93, Mar 1998. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9492017> >.
- 83 TAZZARI, P. L. et al. The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells exhibiting autocrine insulin-like growth factor-I secretion. **Leukemia**, v. 21, n. 5, p. 886-96, May 2007. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17361225> >.
- 84 BAUMANN, P. et al. Myeloma cell growth inhibition is augmented by synchronous inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor by NVP-AEW541 and inhibition of mammalian target of rapamycin by Rad001. **Anticancer Drugs**, v. 20, n. 4, p. 259-66, Apr 2009. ISSN 1473-5741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19240643> >.
- 85 GOTLIEB, W. H. et al. Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 100, n. 2, p. 389-96, Feb 2006. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16300820> >.
- 86 MUKOHARA, T. et al. Sensitivity of breast cancer cell lines to the novel insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) inhibitor NVP-AEW541 is dependent on the level of IRS-1 expression. **Cancer Lett**, v. 282, n. 1, p. 14-24, Sep 2009. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345478> >.
- 87 CHAPUIS, N. et al. Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. **Haematologica**, v. 95, n. 3, p. 415-23, Mar 2010. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007139> >.
- 88 LAFAVE, L. M.; LEVINE, R. L. Targeting a regulator of protein homeostasis in myeloproliferative neoplasms. **Nat Med**, v. 22, n. 1, p. 20-1, Jan 2016. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26735404> >.
- 89 JI, Q. S. et al. A novel, potent, and selective insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor blocks insulin-like growth factor-I receptor signaling in vitro and inhibits insulin-like growth factor-I receptor dependent tumor growth in vivo. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 8, p. 2158-67, Aug 2007. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671083> >.
- 90 MULVIHILL, M. J. et al. Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. **Future Med Chem**, v. 1, n. 6, p. 1153-71, Sep 2009. ISSN 1756-8927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21425998> >.

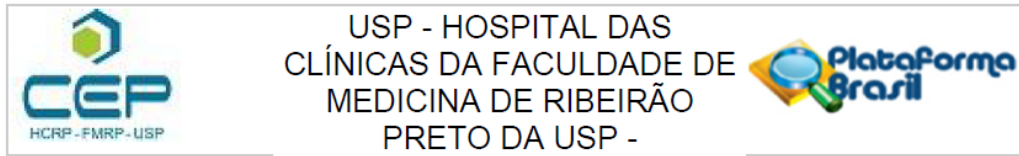
- 91 JONES, R. L. et al. Phase I study of intermittent oral dosing of the insulin-like growth factor-1 and insulin receptors inhibitor OSI-906 in patients with advanced solid tumors. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 4, p. 693-700, Feb 2015. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25208878> >.
- 92 PUZANOV, I. et al. A phase I study of continuous oral dosing of OSI-906, a dual inhibitor of insulin-like growth factor-1 and insulin receptors, in patients with advanced solid tumors. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 4, p. 701-11, Feb 2015. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25212606> >.
- 93 FASSNACHT, M. et al. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 4, p. 426-35, Apr 2015. ISSN 1474-5488 (Electronic) 1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795408> >.
- 94 REUVENI, H. et al. Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment. **Cancer Res**, v. 73, n. 14, p. 4383-94, Jul 2013. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23651636> >.
- 95 FLASHNER-ABRAMSON, E. et al. Targeting melanoma with NT157 by blocking Stat3 and IGF1R signaling. **Oncogene**, v. 35, n. 20, p. 2675-80, May 2016. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119932> >.
- 96 IBUKI, N. et al. The tyrphostin NT157 suppresses insulin receptor substrates and augments therapeutic response of prostate cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 13, n. 12, p. 2827-39, Dec 2014. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267499> >.
- 97 GAROFALO, C. et al. Preclinical Effectiveness of Selective Inhibitor of IRS-1/2 NT157 in Osteosarcoma Cell Lines. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 74, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26029165> >.
- 98 FENERICH, B. A. et al. NT157 has antineoplastic effects and inhibits IRS1/2 and STAT3/5 in JAK2. **Signal Transduct Target Ther**, v. 5, p. 5, 2020. ISSN 2059-3635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31993221> >.
- 99 PALACIOS, R.; STEINMETZ, M. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. **Cell**, v. 41, n. 3, p. 727-34, Jul 1985. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3924409> >.
- 100 DALEY, G. Q.; BALTIMORE, D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 23, p. 9312-6, Dec 1988. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3143116> >.

- 101 WARMUTH, M. et al. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. **Curr Opin Oncol**, v. 19, n. 1, p. 55-60, Jan 2007. ISSN 1040-8746. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17133113> >.
- 102 LEE, Y. et al. Inhibition of IGF1R signaling abrogates resistance to afatinib (BIBW2992) in EGFR T790M mutant lung cancer cells. **Mol Carcinog**, v. 55, n. 5, p. 991-1001, May 2016. ISSN 1098-2744. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052929> >.
- 103 MIN, H. Y. et al. Targeting the insulin-like growth factor receptor and Src signaling network for the treatment of non-small cell lung cancer. **Mol Cancer**, v. 14, p. 113, Jun 2015. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26041671> >.
- 104 LEIPHRAKPAM, P. D. et al. In vivo analysis of insulin-like growth factor type 1 receptor humanized monoclonal antibody MK-0646 and small molecule kinase inhibitor OSI-906 in colorectal cancer. **Oncol Rep**, v. 31, n. 1, p. 87-94, Jan 2014. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173770> >.
- 105 GEORGIADES, P. et al. VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. **Genesis**, v. 34, n. 4, p. 251-6, Dec 2002. ISSN 1526-954X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434335> >.
- 106 SANCHEZ-LOPEZ, E. et al. Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling. **Oncogene**, v. 35, n. 20, p. 2634-44, 05 2016. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26364612> >.
- 107 CHEN, E.; MULLALLY, A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2014, n. 1, p. 268-76, Dec 2014. ISSN 1520-4383. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25696866> >.
- 108 FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. **J Biol Chem**, v. 285, n. 8, p. 5296-307, Feb 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028972> >.
- 109 YAN, D.; HUTCHISON, R. E.; MOHI, G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. **Blood**, v. 119, n. 15, p. 3539-49, Apr 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22144185> >.
- 110 RODRIGUES ALVES, A. P. N. et al. IGF1R/IRS1 targeting has cytotoxic activity and inhibits PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling in acute lymphoblastic leukemia cells. **Cancer Lett**, v. 456, p. 59-68, 08 2019. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31042587> >.

- 111 BENITO-JARDÓN, L. et al. Resistance to MAPK Inhibitors in Melanoma Involves Activation of the IGF1R-MEK5-Erk5 Pathway. **Cancer Res**, v. 79, n. 9, p. 2244-2256, May 2019. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30833419> >.
- 112 ALSINA-SANCHIS, E. et al. The TGF $\beta$  pathway stimulates ovarian cancer cell proliferation by increasing IGF1R levels. **Int J Cancer**, v. 139, n. 8, p. 1894-903, 10 2016. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27299695> >.
- 113 ZINN, R. L. et al. ERK phosphorylation is predictive of resistance to IGF-1R inhibition in small cell lung cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 6, p. 1131-9, Jun 2013. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23515613> >.
- 114 FOX, E. M. et al. A kinome-wide screen identifies the insulin/IGF-I receptor pathway as a mechanism of escape from hormone dependence in breast cancer. **Cancer Res**, v. 71, n. 21, p. 6773-84, Nov 2011. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908557> >.
- 115 BASU, T. et al. Pharmacological Inhibition of Insulin Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) Alone or in Combination With Ruxolitinib Shows Therapeutic Efficacy in Preclinical Myeloproliferative Neoplasm Models. **Hemasphere**, v. 5, n. 5, p. e565, May 2021. ISSN 2572-9241. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33954282> >.
- 116 MACHADO-NETO, J. A. et al. Autophagy inhibition potentiates ruxolitinib-induced apoptosis in JAK2. **Invest New Drugs**, v. 38, n. 3, p. 733-745, 06 2020. ISSN 1573-0646. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31286322> >.
- 117 SCOPIM-RIBEIRO, R. et al. NT157, an IGF1R-IRS1/2 inhibitor, exhibits antineoplastic effects in pre-clinical models of chronic myeloid leukemia. **Invest New Drugs**, Jan 2021. ISSN 1573-0646. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33403501> >.

**ANEXOS**

**ANEXO A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Investigação de mutações na via IGF1R/IRS em neoplasia mieloproliferativa e o efeito de inibidores farmacológicos desta via de sinalização em modelo murino knockin para a mutação JAK2V617F

**Pesquisador:** Fabíola Traina

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 38394820.3.0000.5440

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.306.679

**Apresentação do Projeto:**

O objetivo do trabalho é investigar os aspectos moleculares e translacionais da participação da via IGF1R/IRS na fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMP). Os inibidores farmacológicos seletivos de IGF1R/IR (OSI-906) e de IGF1R/IRS (NT157) serão testados em modelo murino de NMP knockin para JAK2 V617F; os animais serão submetidos à análise de carga tumoral e sobrevida. Serão avaliados o efeito destes inibidores farmacológicos, in vitro e in vivo, na ativação de vias de sinalização e na sobrevivência de células murinas BaF3 mutadas para JAK2, CALR ou MPL.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo geral do presente projeto de pesquisa é investigar os aspectos moleculares e translacionais da participação da via IGF1R/IRS na fisiopatologia das NMP BCR-ABL1 negativas

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

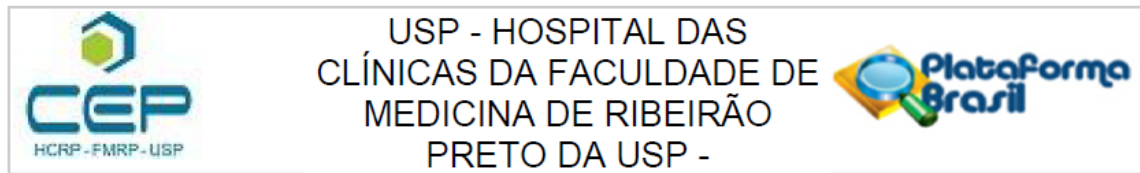
**Riscos:** Desconforto e dor na coleta de sangue e medula óssea.

**Benefícios:** não haverá benefícios diretos para os pacientes porém poderá esclarecer mecanismos moleculares da fisiopatologia de neoplasias mieloproliferativas crônicas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto experimental com murinos (tese de doutorado) com boa fundamentação científica,

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



Continuação do Parecer: 4.306.679

objetivos definidos e metodologia adequada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentos devidamente apresentados

**Recomendações:**

Não se aplica

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1 data 17/02/2020, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1631393.pdf	23/09/2020 12:29:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_3.pdf	23/09/2020 12:29:02	Jaqueline Cristina Fernandes	Aceito
Cronograma	Cronograma_jaqueline_2.pdf	23/09/2020 10:01:01	Jaqueline Cristina Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_JAQUELINE.pdf	22/09/2020 15:20:43	Jaqueline Cristina Fernandes	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	22/09/2020 15:19:09	Jaqueline Cristina Fernandes	Aceito
Orçamento	Aprovacao_orcamento.pdf	22/09/2020 15:17:58	Jaqueline Cristina Fernandes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	22/09/2020 09:09:42	Jaqueline Cristina Fernandes	Aceito

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO

**Bairro:** MONTE ALEGRE

**CEP:** 14.048-900

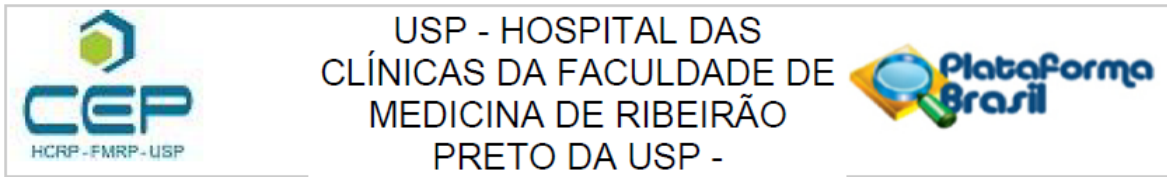
**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3602-2228

**Fax:** (16)3633-1144

**E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.306.679

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 29 de Setembro de 2020

---

**Assinado por:**  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
(Coordenador(a))

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



**ANEXO B - Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo CEUA 052/2017)**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



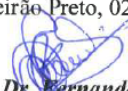
## **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Investigação de mutações na via IGF1R/IRS em neoplasia mieloproliferativa e o efeito de inibidores farmacológicos desta via de sinalização em modelo murino knockin para a mutação JAK2V617F*”, registrado com o número **052/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Fabíola Traina**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 02 de agosto de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 120 camundongos NSG machos pesando 22g, 20 camundongos Pep Boy machos pesando 23g e 2 camundongos JAK2 machos pesando 25g oriundos do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 02/08/2017 a 15/07/2021.

We certify that the Protocol n° 052/2017, entitled “*Investigation of mutations in IGF1R/IRS pathway in myeloproliferative neoplasm and the effect of pharmacological inhibitors of this signaling pathway in JAK2V617F knockin murine model*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/02/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 120 male NSG mice weighing 22g, 20 male Pep Boy mice weighing 23g and 2 male JAK2 mice weighing 25g from the Laboratory of Experimental Studies in Animals of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/15/2021.

Ribeirão Preto, 02 de agosto de 2017

  
**Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro**  
Vice-Presidente da CEUA-FMRP – USP,  
em exercício