

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JUAN LUIZ COELHO DA SILVA

**Prospecção clínica e molecular de novos alvos terapêuticos em
neoplasias mieloides**

Ribeirão Preto

2021

JUAN LUIZ COELHO DA SILVA

Prospecção clínica e molecular de novos alvos terapêuticos em neoplasias mieloides

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Traina

Co-orientador: João Agostinho Machado Neto

Ribeirão Preto

2021

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade De Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Silva, Juan Luiz Coelho da

Prospecção clínica e molecular de novos alvos terapêuticos em neoplasias mieloides – Ribeirão Preto, 2021

158p.: il.; 30cm

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. Sinalização de IGF1R-IRS1/2 2. Metabolismo 3. Metformina 4. Célula tronco hematopoiética 5. Estratificação de risco

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) - Código de Financiamento 001;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Projeto nº 2016/23191-4;
- 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: SILVA, Juan Luiz Coelho da

Título: Prospecção clínica e molecular de novos alvos terapêuticos em neoplasias mieloides

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Às memórias de minha avó Lucília Rodrigues da Silva
exemplo de perseverança e força, e de meu avô Luiz
Coelho da Silva e meu primo Lucianno Brayan Lopes
Saturno, lembranças de carinho.

À inestimável companhia, compreensão, carinho e
amor das mulheres que a vida me presenteou como
mãe, Lindomar Lopes da Silva, e como companheira
Lylyan Fragoso Pimentel.

AGRADECIMENTOS

Segundo a receita epicurista da felicidade, “as pessoas felizes lembram o passado com gratidão, alegram-se com o presente e encaram o futuro sem medo”. As pessoas listadas aqui fizeram parte da concretização da equação inspirada por Epicuro, e a elas meu mais sincero agradecimento. Tive sempre muita sorte em me reunir com pessoas maravilhosas, verdadeiramente melhores que eu, e que me ajudaram a evoluir como filho, amigo e pesquisador.

À minha família, fonte de sustentação, suporte e muita alegria. Agradeço a meus pais, Lindomar Lopes da Silva e Josemar Coelho da Silva, que sempre inspiraram a mim e meu irmão Igor Leonardo Coelho da Silva a dedicação para uma vida digna e valorizaram nossa educação. À minha namorada e companheira Lylyan Fragoso Pimentel, de cujo convívio, companheirismo e apoio encontro parte considerável de minha força de vontade e planejamentos. Aos demais membros da minha família que fazem parte da construção de um ambiente de carinho e amor, pilares da pessoa que sou.

À prof.^a Fabíola Traina, minha orientadora, no sentido lato da palavra, agradeço o suporte e a dedicação para minha formação. Espero ter atendido reciprocamente para construção de uma relação construtiva e após quase 5 anos de convívio tenho certeza que vir a Ribeirão Preto foi o melhor para minha formação. Estendo os agradecimentos aos companheiros de equipe que propiciam um ambiente produtivo e fraterno de trabalho: Antonio Bruno Alves da Silva, Bruna Fenerich Alves, Fernanda Borges da Silva, Jaqueline Cristina Fernandes, Natasha Peixoto Fonseca, Raíssa Silva Tristão e Virgínia Campos Silvestrini.

Aos amigos que a vida acadêmica me trouxe, entre os quais menciono Diego Antonio Pereira Martins, meu co-orientador João Agostinho Machado Neto, meus orientadores do mestrado Prof. Antonio Roberto Lucena Araujo e Prof. Marcos André Cavalcanti Bezerra, Thiago Mantello Bianco, Isabel Weinhäuser e Douglas Rafael Almeida Silveira. Vocês são sintomas da criação de um ambiente produtivo de trabalho e de bem estar que espero ser capaz de cultivar por muito tempo.

Aos outros amigos que a vida acadêmica me distanciou, nossas lembranças são motivos de sorrisos cotidianos, espero encontrá-los logo: Fernanda Gutierrez Rodrigues, Renata Scopim Ribeiro, Pedro Luiz de França Neto, Matheus Filgueira Bezerra, Igor de Farias Domingos, Gustavo Borges, Luciana Yamamoto de Almeida.

Aos membros da banca avaliadora que dispuseram tempo para a conclusão desta etapa extremamente relevante de minha carreira. É motivo de orgulho reunir pessoas como a Prof.^a Letícia Veras Costa Lotufo, Prof. Erich Vinícius de Paula e Prof. Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues para o julgamento de minha tese.

A todos os professores que se dedicaram à minha formação e me ajudaram inconscientemente a decidir que caminho profissional seguir.

Ao suporte estrutural do Hemocentro de Ribeirão Preto, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e da Universidade de São Paulo para desenvolvimento da pesquisa e das oportunidades de desenvolvimento profissional. Além das instituições, às pessoas que as compõem: Joana, Dalva Tereza Catto, Priscila Scheucher, Ana Silvia Lima Gouveia Yamada, Josiane Lilian Schiavinato, Bárbara Amélia Santana, Silvia Helena Costa, Rosana Maria de Oliveira, Diva Hodniki, Ivana Barizza Souza, Rita de Cássia, Virgínia Helena Leira Lipoli Bertini, Denise Aparecida Palma, Adriana Dore e Karina Soto.

Aos professores com quem tive a honra e oportunidade de colaborar e, por extensão, aos seus respectivos grupos de pesquisa: Eduardo Magalhães Rego, Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes, Vanderson Rocha, Vitor Marcel Faça

Ao programa de pós-graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular pelo suporte oferecido durante o doutorado e pela excepcional capacitação oferecida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2016/23191-4.

*Jamais eu queria vir a ser um dia
o que o maior de todos já o tivesse sido
eu quero sempre muito mais
e mais ainda, muito pr'além-demais-Infinito...
Tu não sabes, meu bruto, que nós vivemos tão pouco
que ficamos sempre a meio-caminho do Desejo?*

Almada Negreiros em Cena do Ódio

RESUMO

SILVA, Juan Luiz Coelho da. Prospecção clínica e molecular de novos alvos terapêuticos em neoplasias mieloides. 2021. Tese (Doutorado em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A implementação de novas estratégias terapêuticas é dependente da elucidação de mecanismos não explícitos e da identificação de fatores clínicos e biológicos que particularizem pacientes para terapias ajustadas ao risco. Apesar do crescente interesse na implementação de terapias alvo, o reposicionamento de drogas tem ganhado notoriedade como estratégia para encurtar o tempo e os custos envolvidos na implementação de novas terapias. Através de investigação multi-experimental, objetivamos identificar novos preditores clínicos e fornecemos as evidências pré-clínicas para novas oportunidades terapêuticas em neoplasias mieloides. Utilizando modelo murino *knockin* com expressão condicionada da expressão Jak2V617F, investigamos os efeitos do tratamento com metformina na célula tronco hematopoiética (CTH) de neoplasia mieloproliferativa (NMP). O tratamento com metformina reduziu a esplenomegalia, frequência de progenitores eritroides precoces no baço e contagem de plaquetas no sangue periférico e a capacidade clonogênica de células mononucleares de medula óssea. Setenta e sete genes foram diferencialmente expressos entre células Kit enriquecidas de animais tratados com metformina em comparação aos tratados com veículo, dos quais 30 tiveram expressão diminuída e 47 aumentada. Sumariamente, o tratamento com metformina reduziu a esplenomegalia em modelo murino de NMP, mas não emerge como estratégia terapêutica curativa ao não afetar a frequência dos progenitores da NMP. Através de estratégia transcriptômica, desenvolvemos um índice prognóstico para pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) baseado na expressão de genes envolvidos nos processos de glicólise, fosforilação oxidativa e ciclo dos ácidos tricarboxílicos, por conveniência chamados de processos de energética celular. O índice molecular (MBS), foi capaz de estratificar pacientes em três grupos de risco distintos, sendo o risco adverso independentemente associado a sobrevida global inferior. O índice baseado em energética celular foi capaz também de distinguir molecularmente os pacientes utilizando análise de enriquecimento gênico, em que o aumento do risco esteve associado a progressão do ciclo celular, proliferação e indiferenciação da CTH. O MBS emerge como escore molecular de risco para pacientes com SMD e indica potenciais alvos para intervenção terapêutica. A via de sinalização do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1R) e dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS1/2) tem importante função no desenvolvimento de diversas neoplasias, mas foram pouco estudados em leucemia mieloide aguda (LMA). A expressão de *IGF1R*, *IGF2R*, *IRS1* e *IRS2* foi determinada nas coortes de LMA do atlas do genoma do câncer (n=173) e do consórcio internacional de leucemia promielocítica aguda (n=105). A alta expressão de *IGF1R* e da razão de expressão de *IGF1R/IGF2R* identificaram pacientes com prognóstico desfavorável para LMA e LPA. A expressão diminuída de *IRS1* foi associada a prognóstico desfavorável em pacientes com LMA. As linhagens celulares de

LMA NB4, NB4-R2, Kasumi-1, THP1, Molm13 e MV4;11 foram tratadas com os inibidores de IGF1R-IRS1/2 linsitinibe e NT157 e submetidas a ensaios de citotoxicidade e funcionais. Coletivamente, o linsitinibe atuou como inibidor citostático e induziu autofagia como mecanismo limitante de sua eficiência, superado pela combinação com o inibidor de autofagia cloroquina. O NT157 foi um agente citotóxico em todas as linhagens, reduziu a proliferação celular, induziu apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio e despolarização da membrana mitocondrial. Molecularmente, ambos os compostos inibiram as vias de IGF1R-IRS1/2, PI3K/AKT/mTOR, MAPK, induziram dano no DNA e clivagem de caspase 3. A ativação da via de MAPK de estresse celular foi ativada apenas em resposta a terapia com NT157, sugerindo ser um mecanismo não explícito específico desse composto. Em conclusão, a inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 é uma oportunidade terapêutica promissora para LMA com eficiências e mecanismos distintos segundo o ponto de intervenção, receptor ou efetores citoplasmáticos.

Palavras-chave: Sinalização de IGF1R-IRS1/2; Metabolismo; Metformina; Célula tronco hematopoiética; Prognóstico

ABSTRACT

SILVA, Juan Luiz Coelho da. Clinical and molecular prospection of new therapeutic targets for myeloid neoplasms. 2021. Thesis (Doctorate program in clinical oncology, stem cells and cell-based therapy) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The implementation of new therapeutic strategies is dependent on the elucidation of non-explicit mechanisms and the identification of clinical and biological factors that distinguish patients for risk-adjusted therapies. Despite the growing interest in implementing target therapies, drug repositioning has gained notoriety as a strategy to shorten the time and costs involved in implementing new therapies. Through multi-experimental investigation, we aimed to identify new clinical predictors and provide preclinical evidence of new therapeutic opportunities in myeloid neoplasms. Using a knockin murine model with a conditioned expression of Jak2V617F expression, we investigated the effects of treatment with metformin on the hematopoietic stem cell (HSC) of myeloproliferative neoplasm (MPN). Treatment with metformin reduced splenomegaly, frequency of early erythroid progenitors in the spleen, platelet count in peripheral blood, and the clonogenic capacity of bone marrow mononuclear cells. Seventy-seven genes were differentially expressed between Kit-enriched cells from metformin-treated animals in comparison to those treated with vehicle, of which 30 were downregulated and 47 upregulated. In summary, treatment with metformin reduced splenomegaly in a murine model of MPN, but it does not emerge as a curative therapeutic strategy as it does not affect the MPN progenitors' frequency. Through a transcriptomic strategy, we have developed a prognostic index for patients with myelodysplastic syndrome (MDS) based on the expression of genes involved in the processes of glycolysis, oxidative phosphorylation, and the tricarboxylic acids cycle, hereafter called cellular energetics processes. The molecular index (MBS) was able to stratify patients into three different risk groups. The adverse risk was independently associated with inferior overall survival. The score based on cellular energetics was also able to molecularly distinguish patients using gene-set enrichment analysis, in which the increased risk was associated with cell cycle progression, proliferation, and undifferentiation of HSC. MBS emerges as a molecular risk score for patients with MDS and indicates potential targets for therapeutic intervention. The signaling pathway of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) and insulin receptor substrates 1 and 2 (IRS1/2) has an important role in the development of several neoplasms but were underexplored in acute myeloid leukemia (AML). The expression of *IGF1R*, *IGF2R*, *IRS1*, and *IRS2* was determined in the AML cohorts of the cancer genome atlas (n=173) and the international consortium of acute promyelocytic leukemia (n=105). The high expression of *IGF1R* and the expression ratio of *IGF1R/IGF2R* identified patients with unfavorable prognosis for AML and APL. The decreased expression of *IRS1* has been associated with an unfavorable prognosis in patients with AML. AML cell lines NB4, NB4-R2, Kasumi-1, THP1, Molm13, and MV4; 11 were treated with IGF1R-IRS1/2 inhibitors linsitinib and NT157 and subjected to cytotoxicity and functional assays. Collectively, linsitinib acted as a cytostatic inhibitor and induced autophagy as a limiting mechanism of

its efficiency, surpassed by the combination with the chloroquine autophagy inhibitor. NT157 was a cytotoxic agent in all cell lines, reduced cell proliferation, induced apoptosis, production of reactive oxygen species, and depolarization of the mitochondrial membrane. Molecularly, both compounds inhibited the IGF1R-IRS1/2, PI3K/AKT/mTOR, MAPK pathways, induced DNA damage, and caspase cleavage 3. Activation of the MAPK pathway of cell stress was activated only in response to therapy with NT157, suggesting that it is a non-explicit mechanism specific to this compound. In conclusion, the pharmacological inhibition of IGF1R-IRS1/2 emerges as a promising therapeutic opportunity for AML with different efficiencies and mechanisms according to the point of intervention, receptor, or cytoplasmic effectors.

Keywords: IGF1R-IRS1/2 signaling pathway, Metabolism, Metformin, Hematopoietic Stem Cell; Prognosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: O tratamento com metformina diminui a hematopoese extramedular em camundongos com neoplasia mieloproliferativa Jak2 ^{V617F}	58
Figura 2: O tratamento com metformina altera a distribuição dos progenitores eritroides em modelo murino de NMP.....	59
Figura 3: O tratamento com metformina afeta a função da célula tronco da NMP.....	60
Figura 4: Associação de expressão gênica de elementos metabólicos selecionados para o <i>Molecular-Based Score</i> (MBS).....	65
Figura 5: Análise de sobrevida para pacientes com síndromes mielodisplásicas de acordo com <i>Molecular-Based Score</i> (MBS).....	69
Figura 6: Análise de sobrevida para pacientes com síndromes mielodisplásicas de risco muito baixo e baixo e distribuição do risco MBS e IPSS-R.....	71
Figura 7: As entidades do MBS são associadas com diferentes programas transcriptômicos.....	72
Figura 8: Associação de expressão de IGF1R e IGF2R de acordo com a estratificação de risco para pacientes com LMA.....	74
Figura 9: Desfechos clínicos para pacientes com leucemia mieloide aguda de acordo com a expressão de IGF1R e IGF2R.....	75
Figura 10: Desfechos clínicos para pacientes com leucemia promielocítica aguda de acordo com a expressão de <i>IGF1R</i> e <i>IGF2R</i>	77
Figura 11: Linsitinibe possui efeitos antineoplásicos em células primárias de pacientes com LMA.....	79
Figura 12: A inibição farmacológica de IGF1R diminui a viabilidade celular de linhagens celulares de LMA.....	80
Figura 13: Linsitinibe induz apoptose em linhagens celulares de LMA.....	81
Figura 14: Linsitinibe induz autofagia e tem suas atividades antineoplásicas potencializadas pela combinação com a inibição farmacológica da autofagia em linhagens celulares de LMA.....	83
Figura 15: O tratamento com Linsitinibe modula as vias de sinalização IGF1R/IRS, PI3K/AKT/mTOR e MAPK em linhagens celulares de LMA.....	84
Figura 16: Análise de enriquecimento gênico adiciona novas perspectivas no conhecimento de processos biológicos regulados por <i>IGF1R</i> e <i>IGF2R</i> em LMA.....	86
Figura 17: Desfechos clínicos para pacientes com leucemia mieloide aguda de acordo com a expressão de <i>IRS1</i>	87
Figura 18: Associação de expressão de <i>IRS1</i> e <i>IRS2</i> de acordo com alterações citogenéticas recorrentes em LMA.....	89
Figura 19: NT157 possui efeitos antineoplásicos em células primárias de pacientes com LMA.....	90
Figura 20: A inibição farmacológica de IGF1R diminui a viabilidade celular de linhagens celulares de LMA.....	91
Figura 21: NT157 induz apoptose em linhagens celulares de LMA.....	92
Figura 22: NT157 afeta a função mitocondrial em linhagens celulares de LMA.....	93
Figura 23: O tratamento com NT157 modula as vias de sinalização IGF1R/IRS, PI3K/AKT/mTOR e MAPK em linhagens celulares de LMA.....	94
Figura 24: Associação de expressão de componentes da via de sinalização IGF1R-IRS1/2 de acordo com o status mutacional de FLT3.....	95
Figura 25: Desfechos clínicos para pacientes com LMA FLT3 mutado de acordo com a expressão de <i>IGF1R</i> e <i>IRS1</i>	96
Figura 26: A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 tem efeitos citotóxicos em linhagens celulares de LMA com FLT3 mutado.....	98
Figura 27: A inibição farmacológica de FLT3 modula as vias IGF1R/IRS, PI3K/AKT/mTOR em linhagens celulares de LMA.....	100
Figura 28: O tratamento com inibidores de IGF1R-IRS1/2 tem efeitos em diversos processos celulares em linhagens de LMA.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos genes selecionados para proposição de um índice prognóstico baseado em expressão gênica e para expressão gênica diferencial entre pacientes com síndrome mielodisplásica e indivíduos saudáveis.....	49
Tabela 2: Linhagens celulares utilizadas e meios de cultivo.....	50
Tabela 3: Lista de anticorpos utilizados.....	54
Tabela 4. Lista de genes associados a sobrevida global em análise univariada.....	66
Tabela 5: Características clínicas dos pacientes com SMD incluídos para o cálculo do índice baseado em expressão gênica (MBS).....	67
Tabela 6. Análises univariada e multivariada para sobrevida global de pacientes com SMD.....	69
Tabela 7: Sobrevida global (SG) e poder preditivo de IPSS-R e MBS.....	70
Tabela 8: Validação interna por reamostragem pelo método de <i>Bootstrap</i> para sobrevida global (SG).....	70
Tabela 9: Análise univariada e multivariada para os pacientes com LMA provenientes do estudo do TCGA.....	76
Tabela 10: Análise univariada e multivariada para os pacientes com LPA.....	78
Tabela 11: Análises univariadas e multivariadas para sobrevida global e sobrevida livre doença para pacientes com LMA do estudo TCGA.....	88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Neoplasias mieloides	19
1.1.1 Neoplasias mieloproliferativas	20
1.1.2 Síndromes mielodisplásicas	24
1.1.3 Leucemia mieloide aguda	26
1.2 Desregulação do metabolismo e da energética celular como fatores oncológicos	29
1.2.1 Reposicionamento terapêutico da metformina como agente antineoplásico	34
1.3 Via de sinalização canônica e não canônica do receptor do fator de crescimento semelhante a insulina e dos substratos do receptor da insulina	36
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Estabelecimento de modelo murino de neoplasia mieloproliferativa para tratamento com metformina	45
3.2 Casuística e protocolo de tratamento	47
3.3 Proposição de um índice prognóstico baseado em expressão gênica para pacientes com síndrome mielodisplásica	48
3.3.1 Análise transcriptômica de células CD34 de pacientes com SMD	48
3.3.2 Modelagem do índice prognóstico	49
3.4 Linhagens celulares	49
3.5 Reagentes químicos	50
3.5.1 Meios de cultura	50
3.5.2 Compostos	50
3.6 Ensaios funcionais	51
3.6.1 Avaliação da viabilidade celular	51
3.6.2 Avaliação da apoptose celular através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo	51
3.6.3 Avaliação da autofagia por citometria de fluxo	52
3.6.4 Avaliação dos efeitos citotóxicos na função mitocondrial	52
3.7 <i>Western blotting</i>	52
3.8 Análise de enriquecimento de conjuntos gênicos	55
3.9 Análise dos dados	55
4. RESULTADOS	57

4.1	Investigação da ação de Metformina sob a célula tronco da NMP	57
4.2	Proposição de um índice prognóstico baseado em assinatura transcriptômica de células CD34 de pacientes com síndromes mielodisplásicas	62
4.3	Expressão diferencial de <i>IGF1R</i> e <i>IGF2R</i> segundo grupos de risco dos pacientes com LMA.....	72
4.4	Expressão de <i>IGF1R</i> e <i>IGF2R</i> prediz prognóstico em LMA:	72
4.5	A inibição farmacológica de IGF1R possui efeitos antineoplásicos em células de pacientes com LMA.....	76
4.6	Investigação das propriedades antineoplásicas <i>in vitro</i> da inibição farmacológica de IGF1R em LMA	77
4.6.1	Linsitinibe reduz a viabilidade de linhagens celulares de LMA.....	77
4.6.2	Linsitinibe induz apoptose em linhagens celulares de LMA	78
4.6.3	Linsitinibe induz autofagia em linhagens celulares de LMA	79
4.6.4	A inibição farmacológica de IGF1R inibe os efetores das vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK em linhagens de LMA	79
4.7	Investigação de mecanismos moleculares relacionados a expressão diferencial dos componentes da via IGF1R-IRS	82
4.8	Impacto prognóstico de IRS1 e IRS2 em pacientes com leucemia mieloide aguda	84
4.9	Investigação da oportunidade terapêutica da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 em modelos pré-clínicos de LMA	86
4.9.1	A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 possui efeitos antineoplásicos em células de pacientes com LMA.....	86
4.9.2	NT157 reduz a viabilidade de linhagens celulares de LMA	87
4.9.3	NT157 induz apoptose em linhagens celulares de LMA	88
4.9.4	NT157 afeta a função mitocondrial em linhagens celulares de LMA.....	89
4.9.5	A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 inibe as vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK em linhagens de LMA	90
4.10	Investigação da participação da via de sinalização IGF1R-IRS1/2 na LMA associada a mutações em FLT3.....	92
4.11	Investigação pré-clínica da inibição farmacológica da via de sinalização IGF1R-IRS1/2 em modelos celulares de LMA associadas a mutação em FLT3.....	93
4.11.1	A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 desempenha efeito antineoplásico em linhagens celulares de LMA FLT3 ^{MUT}	94
4.11.2	A inibição farmacológica de FLT3 inibem vias de crescimento celular ...	96
4.11.3	IGF1R-IRS1/2 interferem em vias de sinalização de crescimento celular	96
5.	DISCUSSÃO	99
5.	CONCLUSÕES	109
6.	Referências	110
7.	Anexos.....	135

7.1	Anexo A.....	135
7.2	Anexo B.....	136
7.3	Anexo C.....	139

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias mieloides

A classificação de entidades clínicas tem o objetivo de reconhecer doenças claramente definidas, clinicamente distintas e mutuamente exclusivas, permitindo a padronização do diagnóstico, tratamento e estudos. Segundo preconizado pela organização mundial da saúde (OMS), a classificação das neoplasias mieloides é baseada em características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas das células neoplásicas, definição da linhagem celular, grau de maturação e na determinação dos aspectos citológicos como normais ou displásicos (i.e. morfológicamente alterados). A implementação de estudos genéticos moleculares permitiu o reconhecimento de entidades geneticamente definidas, bem como é um importante parâmetro para definição de progressão ou resistência da doença (SWERDLOW et al., 2017).

As neoplasias mieloides compreendem um conjunto heterogêneo de doenças e são classificadas segundo a OMS em (SWERDLOW et al., 2017):

- (i) neoplasias mieloproliferativas;
- (ii) mastocitose;
- (iii) neoplasia mioeloides/linfóide com eosinofilia e rearranjo gênico (*PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* e *PCM1-JAK2*);
- (iv) neoplasia mieloproliferativas/mielodisplasia;
- (v) síndromes mielodisplásicas;
- (vi) neoplasia mioeloides com predisposição germinativa;
- (vii) leucemia mioeloides aguda;
- (viii) neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides;
- (ix) leucemia aguda de linhagem ambígua.

As classes supracitadas compreendem grupos de doenças que comprometem o mecanismo fisiológico de diferenciação do componente mioeloides da hematopoiese humana, mas que diferem quanto a origem, curso clínico e abordagens terapêuticas. Em razão de suas prevalências, particularidades do curso clínico e aspectos fisiopatológicos, as neoplasias mieloproliferativas (NMP), síndromes mielodisplásicas (SMD) e leucemia mioeloides aguda (LMA) são as classes mais amplamente estudadas entre as

neoplasias mieloides e foram escolhidas para o desenvolvimento do presente projeto.

1.1.1 Neoplasias mieloproliferativas

As neoplasias mieloproliferativas são doenças clonais da célula tronco hematopoética (CTH) que conduzem a produção aumentada e irresponsiva aos mecanismos reguladores dos elementos celulares terminais da linhagem mieloide. Esta proliferação exagerada é causada pela aquisição de alterações genéticas recorrentes e específicas, que, incorporadas à classificação preconizada pela OMS, individualiza as entidades em: leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (PMF), leucemia neutrofílica crônica, leucemia eosinofílica crônica e NMP inclassificável (SWERDLOW et al., 2017).

A LMC constitui uma entidade biologicamente distinta em razão de sua fisiopatologia estar relacionada a translocação recíproca e balanceada entre os cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q11;q34)], produzindo o gene de fusão *BCR/ABL1* (MOLICA; MASSARO; BRECCIA, 2017; SWERDLOW et al., 2017). O mesilato de imatinibe, protótipo farmacológico dos inibidores tirosinoquinases competitivos, revolucionou o tratamento da LMC induzindo respostas hematológicas duráveis e aproximando a expectativa de vida dos pacientes diagnosticados ao da população geral (DRUKER et al., 1996; HOCHHAUS et al., 2017). Coletivamente chamadas de NMP *BCR/ABL1* negativas, a PV, TE e MFP são as neoplasias mieloproliferativas mais frequentes e compartilham a ativação desregulada da via de sinalização de JAK/STAT como base de sua fisiopatologia molecular (BARBUI et al., 2015). A seguir, serão abordados os aspectos pertinentes sobre o panorama molecular, diagnóstico, estratificação de risco e tratamentos disponíveis para as NMP *BCR/ABL1* negativas.

Mutações somáticas no gene *JAK2*, que codifica a proteína Janus quinase 2 e está localizado no braço curto do cromossomo 9 (9p24) são responsáveis pelo desenvolvimento de policitemia vera em virtualmente todos os pacientes com PV (BAXTER et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005; SCOTT et al., 2005). Aproximadamente 96% dos pacientes apresentam a mutação pontual ativadora *JAK2* p.V617F (c.G1849T),

localizada no éxon 14, e 3% mutações adicionais distribuídas no éxon 12 (SCOTT et al., 2007). A mutação JAK2V617F é identificada em aproximadamente 55% e 65% dos pacientes com TE e MFP, respectivamente, sendo raras mutações em outras regiões do gene (RUMI et al., 2014; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2016).

A Calreticulina é uma proteína codificada pelo gene *CALR*, localizado em 19p13.2, e trata-se de uma chaperona multifuncional ligante de íons Ca^{2+} com localização no retículo endoplasmático (FUCIKOVA et al., 2021; MICHALAK et al., 1992). A implementação de métodos de sequenciamento de larga escala permitiu a identificação de mutações em *CALR* em 25% – 35% dos pacientes com MFP e 15% – 24% dos pacientes com TE, sendo raras em pacientes com PV (KLAMPFL et al., 2013; NANGALIA et al., 2013). As mutações em *CALR* são localizadas no éxon 9 e induzem mudança da matriz de leitura (*frameshift*), resultando em aquisição de carga elétrica positiva da porção C-terminal da proteína mutante. O desbalanço eletrostático causado pela mutação induz a associação permanente da Calreticulina ao receptor de trombopoetina (TpoR), ativando-o constitutivamente (ELF et al., 2016, 2018). Mutações *missenses* adicionais no *MPL*, gene responsável pela codificação do TpoR e localizado em 1p34, são identificados em 4% dos pacientes com TE e 8% dos pacientes com MFP (PARDANANI et al., 2006; PIKMAN et al., 2006). Estas mutações ocorrem preponderantemente no éxon 10, sendo as mais frequentes *MPL* p.W515L/K, e tornam a sinalização do receptor de trombopoetina independente do ligante. Os pacientes com TE e MFP que não possuem mutações em *JAK2*, *CALR* e *MPL* são chamados de triplo negativo e estão associados a mutações adicionais em reguladores da via JAK2/STAT (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2016).

O diagnóstico da policitemia vera e trombocitemia essencial é baseado em achados clínicos e laboratoriais, destacando-se a poliglobulia (aumento da massa eritroide) e plaquetose (aumento da contagem de plaquetas), respectivamente (SWERDLOW et al., 2017). A detecção da mutação em JAK2V617F em sangue periférico é 97% sensível e virtualmente 100% específica na distinção da PV de outras causas de poliglobulia. A dosagem de eritropoietina sérica é um exame complementar relevante a avaliação de PV, sendo esperada em níveis subnormais para 85% dos

pacientes (MOSSUZ et al., 2004). A detecção de mutação em *JAK2*, *CALR* ou *MPL* em paciente com trombocitose confirma a presença NMP, entretanto, a ausência não exclui o diagnóstico de TE, uma vez que até 20% dos pacientes podem ser triplo-negativos. O diagnóstico de TE exige a avaliação histopatológica da medula óssea e a exclusão de outras causas de plaquetose, uma vez que a apresentação clínica é compartilhada por outras neoplasias mieloides. O diagnóstico diferencial adequado entre as causas de plaquetose possui implicações prognósticas relevantes (TEFFERI; BARBUI, 2020).

Estudos realizados em populações norte americanas e europeias determinaram que a sobrevida mediana de pacientes com TE e PV foi de 20 e 14 anos, respectivamente, e indicaram redução da expectativa de vida quando comparado a população ajustada para idade e sexo (TEFFERI et al., 2014). Os principais fatores de risco incluem idade avançada, aumento da contagem de leucócitos (leucocitose), histórico de trombose e presença de risco cardiovascular. Recentemente, mutações em *SF3B1*, *SRSF2* e *TP53* impactaram negativamente a sobrevida global de pacientes com TE independente de idade e sexo (PASSAMONTI et al., 2012; TEFFERI et al., 2013). Para PV, mutações em *SRSF2* e cariótipo alterado identificam pacientes com prognóstico desfavorável (TEFFERI et al., 2017a, 2020). Ambas PV e TE possuem risco aumentado para progressão para mielofibrose e leucemia mieloide aguda, com incidência estimada de aproximadamente 10% e 5% em 20 anos, respectivamente (TEFFERI; BARBUI, 2020). Em virtude do curso clínico crônico das entidades, os principais sinais e sintomas são relacionados a manifestações hemorrágicas ou trombóticas e prejuízo da qualidade de vida por sintomas constitucionais (BARBUI et al., 2018).

A mielofibrose, primária, pós-TE ou pós-PV, pode se apresentar ao diagnóstico nas fases pré-fibrótica ou fibrótica. Uma vez que as NMP compartilham o panorama clínico e molecular, as características histopatológicas da medula óssea são o principal achado para a definição diagnóstica (SWERDLOW et al., 2017). Entre as características clínicas principais, destacam-se a anemia, hepatoesplenomegalia, sintomas constitucionais (febre, fadiga, suor noturno e prurido) e risco aumentado de sangramento ou trombose (TEFFERI, 2021). A estratificação de risco é

baseada na idade avançada (>65 anos), gravidade das citopenias (anemia com necessidade transfusional e plaquetopenia), leucocitose ($>25 \times 10^3/\mu\text{L}$) com blastos em sangue periférico, presença de sintomas constitucionais e alterações citogenéticas (CERVANTES et al., 2009). Mutações adicionais em *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2* e *U2AF1* foram recentemente incorporadas à estratificação de risco da MFP (GUGLIELMELLI et al., 2018). As principais causas de óbito incluem progressão para LMA, acometendo aproximadamente 20% dos pacientes, e comorbidades que incluem eventos cardiovasculares e as consequências das citopenias, tais como infecção ou sangramentos (TEFFERI, 2021).

Em virtude do curso clínico heterogêneo, a adequada estratificação de risco é essencial para maximizar os benefícios terapêuticos e evitar toxicidade desnecessária. Os objetivos terapêuticos para as NMP BCR/ABL1 negativas são o controle dos sintomas, redução dos eventos hemostáticos e prevenção da evolução para mielofibrose ou LMA (TEFFERI, 2021; TEFFERI; BARBUI, 2020). O tratamento da PV é baseado em flebotomia com o objetivo de manter o hematócrito abaixo de 45% para homens e 42% para mulheres, associado ou não a hidroxiureia para controle da leucocitose ou plaquetose (CHIEVITZ; THIEDE, 2009; MARCHIOLI et al., 2013). Pacientes com TE assintomáticos não requerem tratamento, enquanto aqueles que requerem citorredução podem ser tratados peg-interferon ou hidroxiureia (TEFFERI; BARBUI, 2020). Para pacientes com PV e TE com risco cardiovascular associado, a aspirina é efetiva para evitar episódios microvasculares como enxaqueca, ataque isquêmico transitório ou eritromelalgia (MICHIELS et al., 2006). O tratamento genotóxico utilizando quimioterápicos não apresentou benefício no controle da hematopoiese extramedular ou prolongamento da sobrevida para os pacientes com MFP (TEFFERI, 2021). O interferon é a única opção terapêutica que atua especificamente na célula tronco hematopoiética (CTH) em pacientes com NMP. Em estudos clínicos, o peg-interferon foi capaz de aliviar sintomas constitucionais, reduziu a esplenomegalia e induziu remissão hematológica em 18% dos pacientes com PV e TE, enquanto reduziu a fibrose da medula óssea em parte dos pacientes com MFP (KILADJIAN et al., 2008; QUINTÁS-CARDAMA et al., 2009). Entretanto, o tratamento com interferon não é uniforme entre os pacientes e

efeitos colaterais não desprezíveis, que incluem imunossupressão, toxicidade mieloide e neurotoxicidade, limitam sua aplicação clínica (TEFFERI; BARBUI, 2020).

Em virtude do papel pivotal da via de sinalização JAK2/STAT para a fisiopatologia das NMP, a implementação de terapia alvo contra a via é claramente promissora (PASQUIER et al., 2014). O ruxolitinibe, primeiro inibidor seletivo de JAK1/2 aprovado para uso clínico em pacientes com mielofibrose de alto risco, é eficiente em reduzir a carga de sintomas, esplenomegalia e contagens hematimétricas (DEININGER et al., 2015; HARRISON et al., 2016). Ademais, o ruxolitinibe é capaz de suprimir a produção de citocinas inflamatórias e induzir proliferação dos progenitores hematopoiéticos (KHOURY et al., 2018; SLOSTAD et al., 2018; ZANDVAKILI et al., 2018). Em contrapartida, as células tronco hematopoiéticas não são particularmente afetadas pelo ruxolitinibe, o que limita seu potencial curativo, não inibe a transformação leucêmica, não atenua a fibrose da medula óssea ou reduz a carga alélica da mutação (HARRISON et al., 2016). Coletivamente, o tratamento das NMP BCR/ABL1 não é uniformemente eficiente e a existência de necessidades clínicas não atendidas, tais como opções terapêuticas curativas, reforçam a importância de identificar novos agentes terapêuticos.

1.1.2 Síndromes mielodisplásicas

As síndromes mielodisplásicas (SMD) compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias mieloides com histórias naturais muito distintas. Consideradas como sendo resultado da desregulação do processo de apoptose, a redução das contagens hematimétricas no sangue periférico (citopenias) é o principal achado ao diagnóstico. Atualmente, está demonstrado que a SMD decorre de alterações da CTH decorrentes de desregulação inflamatória e da imunidade inata e múltiplos eventos genômicos. A combinação dessas alterações resulta em risco aumentado de infecção, sangramentos e transformação para LMA (SWERDLOW et al., 2017).

A classificação morfológica preconizada pela OMS subdivide o grupo em: SMD com displasia de uma linhagem, SMD com displasia de múltiplas

linhagens, SMD com sideroblasto em anel, SMD com excesso de blastos, SMD com del(5q) isolado e SMD inclassificável (SWERDLOW et al., 2017). O diagnóstico exige a avaliação da medula óssea por biópsia, determinando aspectos arquiteturais e a celularidade, e aspiração, percentagem de blastos e morfologia das células, sendo necessária a observação de displasias. A citogenética da medula óssea é informativa e especialmente importante para estratificação de risco e como marcador de evolução clonal. A maior parte dos pacientes com SMD apresentam mutações somáticas em genes envolvidos em processos epigenéticos, de *splicing*, reparo de DNA e transdução de sinais. Entretanto, apenas mutações em *SF3B1* possui implicação diagnóstica para a SMD com sideroblasto em anel, sendo as demais mutações complementares ao diagnóstico e na determinação do risco (BEJAR et al., 2011, 2014; BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011; MALCOVATI et al., 2020). Mutações em *RUNX1*, *TP53* ou *EZH2* são notavelmente associadas a desfecho clínico desfavorável (BEJAR et al., 2012; BERNARD et al., 2020; HAASE et al., 2019; HAFERLACH et al., 2014; PAPAEMMANUIL et al., 2013).

A estratificação de risco da SMD é particularmente relevante em virtude da heterogeneidade clínica e porque dela depende o sucesso da terapia ajustada ao risco. O sistema de pontuação prognóstico internacional revisado (IPSS-R, do inglês *Revised-International Prognostic Score System*) é a ferramenta padrão para estratificação de risco em SMD por ser clinicamente disponível e reproduzível em contextos diferentes. São considerados a percentagem de blastos, número e grau de citopenias e o risco citogenético (GREENBERG et al., 2012). As principais limitações da aplicação do IPSS-R são relacionadas a baixa performance entre os pacientes de baixo risco e não ser índice dinâmico (restrito ao diagnóstico). A inclusão de informações adicionais é relevante para refinamento do IPSS-R, com dados consistentes para mutações (BEJAR et al., 2012; HAFERLACH et al., 2014; NAZHA et al., 2016) e dados clínicos (DAVER et al., 2014).

Em virtude de afetar principalmente idosos a partir da sexta década de vida, a maior parte dos pacientes com SMD não toleram abordagens terapêuticas intensivas como o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (Alo-TCTH) (PLATZBECKER, 2019). O conhecimento da complexidade fisiopatológica da SMD ainda não se converteu em benefício

terapêutico, e é de grande interesse para a proposição de terapias menos tóxicas e mais eficientes. Para os pacientes de baixo risco, a terapia objetiva a melhoria das citopenias, necessidade transfusional e melhora da qualidade de vida. As opções terapêuticas incluem agentes estimuladores da eritropoiese, quelação de ferro para pacientes politransfundidos, imunomodulação com lenalidomida ou imunossuppressores (GARCIA-MANERO; CHIEN; MONTALBAN-BRAVO, 2020). Para os pacientes de alto risco, o tratamento objetiva modificar a história natural da doença, limitando a progressão da doença e aumentando a sobrevida, sendo, portanto, tratados com protocolos intensivos de quimioterapia semelhante aos de LMA ou submetidos ao Alo-TCTH. Para os pacientes inelegíveis, a utilização de agentes hipometilantes representam a única opção terapêutica aprovada, entretanto, possuem resposta clínica limitada e os preditores clínicos e moleculares de resposta são controversos (GARCIA-MANERO; CHIEN; MONTALBAN-BRAVO, 2020; PLATZBECKER, 2019).

1.1.3 Leucemia mieloide aguda

A leucemia mieloide aguda resulta da expansão clonal, acúmulo de células mieloides imaturas na medula óssea e potencial de escape para outros sistemas e substituição da hematopoiese com consequente insuficiência hematopoética (DÖHNER et al., 2017; DOMBRET; GARDIN, 2016). Trata-se de condição clínica grave de rápida evolução para óbito com taxa de sobrevida inferior a 25% em 5 anos (BENICIO et al., 2017; FAGUNDES et al., 2006; SILVEIRA et al., 2020; STEIN et al., 2018).

Assim como as demais neoplasias mieloides, as LMA compreendem um grupo heterogêneo de doenças classificadas pela OMS segundo alterações genéticas recorrentes. Estas alterações podem ser classificadas em: LMA com translocações citogenéticas balanceadas ou LMA com mutações gênicas (SWERDLOW et al., 2017). Para o primeiro grupo destacam-se a t(8;21)-*RUNX1/RUNX1T1*, Inv(16;16)-*CBFB/MYH11*, t(15;17)-*PML/RARA* e translocações envolvendo o *KMT2A* (11q23.3). A iniciativa atlas do genoma do câncer (TCGA, do inglês *The Cancer Genome Atlas*), determinou que, em média, cada paciente com LMA possui 13 mutações e ao menos 23 genes são recorrentemente mutados (CANCER GENOME ATLAS

RESEARCH NETWORK et al., 2013). Estão incluídas como entidades também as LMA associadas a mutações em *NPM1*, mutações bialélicas em *CEBPA* e mutações em *RUNX1* (SWERDLOW et al., 2017). Mutações adicionais são muito relevantes para a estratificação de risco e subclassificação dos pacientes, destacando-se as mutações em *FLT3-ITD* (duplicações *in tandem*) e *KIT* (ARBER et al., 2016; DÖHNER et al., 2017; SWERDLOW et al., 2017). Notavelmente, a complexidade molecular para os pacientes com LMA é bastante superior a citada, entretanto, em favor da clareza, restringimos aos aspectos gerais mais relevantes.

Os pacientes apresentam ao diagnóstico sintomas relacionados a insuficiência hematológica, tipicamente anemia, hemorragia e infecção. A OMS estabelece a presença de ao menos 20% de blastos no sangue periférico ou medula óssea como critério diagnóstico. A determinação das translocações t(8;21), Inv(16;16) ou t(15;17) permitem o diagnóstico em pacientes com menos de 20% de blasto (SWERDLOW et al., 2017). Exames complementares incluem imunofenotipagem por citometria de fluxo ou colorações citoquímicas para definição de linhagem mielóide. A identificação de alterações moleculares adicionais é relevante para estratificação de risco e definição de protocolo terapêutico.

A proteína de fusão PML/RARA impede a diferenciação granulocítica terminal e induz estímulos antiapoptóticos aos progenitores mielóides, sendo responsável pelo desenvolvimento de leucemia promielocítica aguda (LPA) em aproximadamente 98% dos pacientes. Os pacientes com LPA apresentam ao diagnóstico risco de desenvolvimento de coagulopatia, associada a coagulação intravascular disseminada e fibrinólise. O tratamento com o ácido transretinoico total (ATRA) é especialmente eficiente para os pacientes com LPA pois induz diferenciação das células imaturas, tendo se tornado o paradigma da terapia de diferenciação para as leucemias e constituindo a base terapêutica atual da LPA. Coletivamente, o protocolo de tratamento, alteração molecular específica e os cuidados clínicos que a coagulopatia ao diagnóstico demandam, tornam a LPA um subtipo específico de LMA, em geral estudado a parte das demais LMA (REGO et al., 2013; SILVA et al., 2019). A estratificação de risco é baseada na presença de leucocitose e/ou plaquetopenia (SANZ et al., 2000). O estado da arte para o tratamento da LPA

não inclui quimioterapia, conjugando o ATRA com trióxido de arsênio (ATO). Apesar dos resultados superiores, muitos países não dispõem do ATO, sendo substituído por antraciclinas (REGO et al., 2013).

A estratificação de risco para os pacientes com LMA não LPA (por conveniência, a partir deste ponto, o termo LMA exclui pacientes com LPA), pode ser realizada através de dados clínicos, idade avançada e contagem de leucócitos são notavelmente relevantes, pesquisa de células residuais após tratamento ou através da combinação de dados moleculares. A principal referência para a determinação do risco é a preconizada pela rede europeia para leucemia (ELN, do inglês *European LeukemiaNet*) que classifica os pacientes em três riscos de acordo com mutações e alterações citogenéticas, destacando-se que os pacientes com t(8;21) ou Inv(16;16) são assinalados como sendo de prognóstico favorável (DÖHNER et al., 2017). Entretanto, há consenso que a classificação da ELN é demasiadamente simplista e tende a superdimensionar o grupo de risco intermediário, sendo informativa a adição de dados a respeito da expressão gênica ou perfil proteômico, especialmente para inclusão de dados de células únicas (HAUBNER et al., 2018; PRADA-ARISMENDY; ARROYAVE; RÖTHLISBERGER, 2017; TYNER et al., 2018; VAN GALEN et al., 2019).

A decisão terapêutica entre protocolos mais ou menos intensos depende de diversos fatores que computam o risco de mortalidade relacionada a terapia, sendo, sempre que possível, objetivado o prolongamento da sobrevida (KANTARJIAN et al., 2006; KRUG et al., 2010; SORROR et al., 2017; WALTER et al., 2011). O regime típico de indução a remissão da LMA consiste na combinação de altas doses de citarabina com antracíclicos, sendo o padrão há mais de 40 anos (WALTER; APPELBAUM; ESTEY, 2020; YATES et al., 1973). Pacientes em remissão precisam de terapia adicional para evitar recidivas precoces, indicando-se transplante de células tronco hematopoiéticas ou quimioterapia como terapias de consolidação. O Alo-TCTH apresenta menor frequência de recidiva, entretanto, conta com elevada morbidade e mortalidade não relacionada a recaída (MRR). Os protocolos clássicos citados permitem sobrevida de longo prazo para uma fração de pacientes de risco favorável (aproximadamente

50%), enquanto para pacientes de risco desfavorável, os resultados são frustrantes (ESTEY, 2016).

A heterogeneidade não aleatória e previsível da resposta à terapia lança luz sobre o conceito de que a classe das LMA é composta por diversas doenças, com demandas terapêuticas particulares. A introdução de novas opções terapêuticas para o tratamento da LMA tem como alvos uma miríade de processos celulares, tais como sinalização de tirosinoquinas, regulação epigenética do DNA e cromatina ou antígenos preferencialmente expressos em células tronco leucêmicas com uso de anticorpos monoclonais (ABDELWAHAB; LEVINE, 2013; DINARDO; CORTES, 2015; DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015; GASIOROWSKI et al., 2014; ROSNER; HENGSTSCHLÄGER, 2012; WANDER; FATHI; LEVIS, 2014). A alta frequência de mutações em *FLT3* (aproximadamente 25% dos pacientes) motivou a produção de inibidores tirosinoquinas seletivos. A adição do midostaurin ao protocolo de indução a remissão melhorou a sobrevida global de pacientes com LMA com mutação em *FLT3* em comparação ao grupo tratado com placebo (STONE et al., 2017). Mais recentemente, o gilteritinibe, inibidor seletivo de *FLT3* de segunda geração, foi aprovado para pacientes com LMA recidivada *FLT3* mutada (PERL et al., 2019). Apesar da implementação desses inibidores, a história natural desse grupo de pacientes não foi significativamente alterada e permanece relevante para pesquisa de opções terapêuticas.

1.2 Desregulação do metabolismo e da energética celular como fatores oncogênicos

Em condições fisiológicas, células não transformadas, em sua maioria em proliferação reduzida ou mesmo quiescentes, a mitocôndria representa a principal fonte da produção de energia através do ciclo de ácidos tricarboxílicos acoplado a fosforilação oxidativa, ambos sediados na matriz mitocondrial. Várias fontes de carbono, tais como piruvato, glutamina e ácidos graxos podem alimentar os ciclos de energia por meio da produção de equivalentes redutores (fosfato dinucleotídeo de adenina e nicotinamida: NADH e dinucleotídeo de adenina e flavina: FADH₂), utilizados em sequência como doadores de elétrons na cadeia transportadora de elétrons e resultando

na produção de adenosina trifosfato (ATP) (CHANDEL, 2014; SANCHO; BARNEDA; HEESCHEN, 2016).

O processo de transformação é dependente da reprogramação do metabolismo celular induzida direta ou indiretamente pelas alterações oncogênicas subjacentes. As alterações dos metabólitos intracelulares e extracelulares causadas pela reprogramação metabólica induzida pelo câncer têm efeitos na expressão gênica, diferenciação e modulação do microambiente. Os principais efeitos metabólicos desta reprogramação podem ser agrupados em: *I* incorporação desregulada de glicose e aminoácidos, *II* uso de modos oportunistas de aquisição de nutrientes, *III* uso de intermediários metabólicos provenientes dos processos de glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos, *IV* aumento da demanda por nitrogênio, *V* alterações na regulação da expressão gênica induzida pelos metabólitos e *VI* interações metabólicas com o microambiente (PAVLOVA; THOMPSON, 2016; STEVENS et al., 2018). Adicionalmente, as células tumorais devem evadir-se dos controles que impedem a progressão do ciclo celular, especialmente em condições metabólicas desfavoráveis, tais como as observadas em microambientes tumorais (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). Em razão dessas particularidades, cada tumor apresenta requerimentos diferentes de cada processo citado.

O acesso celular a glicose é um passo limitante importante para o crescimento oncogênico indiscriminado e a regulação desse processo é compartilhada por diversos sinais de crescimento. Em contraste à contraparte normal, que requer fatores de crescimento para manutenção da viabilidade e proliferação celular, células neoplásicas acumulam alterações oncogênicas que lhes conferem relevante independência desses fatores extracelulares. Pontos moleculares de convergência desses sinais de crescimento são, portanto, reguladores relevantes da reprogramação metabólica. A via de sinalização PI3K/Akt induz a expressão do transportador de glicose GLUT1 e sua translocação para a superfície celular (BARTHEL et al., 1999; WIEMAN; WOFFORD; RATHMELL, 2007). Adicionalmente, Akt potencializa a atividade de hexoquinase (HK), prevenindo o efluxo de glicose para o ambiente extracelular (GOTTLOB et al., 2001). A expressão exógena de Akt é suficiente para estimular a glicólise, restabelecer a viabilidade celular, potencial de

membrana mitocondrial e os níveis de adenosina trifosfato (ATP) em condições restritivas de cultivo (PLAS et al., 2001; RATHMELL et al., 2003). A expressão de Ras também é capaz de induzir a expressão de GLUT1 e aumentar o consumo de glicose (MARTINEZ; SCAFOGLIO, 2020; MURAKAMI et al., 1992).

Os requerimentos metabólicos de uma célula em proliferação diferem em grande medida daqueles de células quiescentes (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). A principal utilização de carbonos reduzidos em células em proliferação é a síntese de uma diversidade de macromoléculas, entre as quais ácidos graxos, colesterol, derivativos carboidratos de pentoses e hexoses, glicerol, nucleotídeos e aminoácidos não essenciais. Em razão disso, a célula tumoral deve converter os nutrientes em conjuntos diferentes de intermediários estruturais a depender da demanda metabólica e do balanço da capacidade de oxidação/redução (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011). A utilização preferencial da glicólise em detrimento da respiração celular aeróbia sediada na mitocôndria por meio do ciclo do ácidos tricarboxílicos, fenômeno conhecido como efeito de Warburg (WARBURG, 1956), é parcialmente explicado pelo balanço desses requerimentos. Em contrapartida, a demonstração de que as mitocôndrias de células tumorais eram capazes de realizar fosforilação oxidativa e que a depleção do DNA mitocondrial reduziu o potencial tumorigênico das células neoplásicas (CAVALLI; VARELLA-GARCIA; LIANG, 1997; MORAIS et al., 1994; TAN et al., 2015) indicam que a presença de mitocôndrias funcionais são necessárias ao crescimento celular. Essas observações sugerem que, ao invés de se tratar de uma adaptação a defeitos na capacidade de respiração, o efeito Warburg trata-se de um estado metabólico que atende a demanda para síntese de intermediários necessários a proliferação celular e exemplifica como as células tumorais subvertem processos celulares necessários a transformação.

Embora a glicólise seja classicamente retratada como um evento molecular de cadeia única que resulta na produção de lactato, uma diversidade de intermediários glicolíticos são utilizados como precursores para síntese de outras macromoléculas. Como exemplo, a primeira da série de vias colaterais, a via das pentoses-fosfato que a partir de glicose-6-fosfato produz NADPH e ribose-5-fosfato, um componente estrutural de nucleotídeos.

A enzima chave para esse processo é a transaldolase (*TALDO*) e está frequentemente hiperexpressa em diversos cânceres (WANG et al., 2011; XIAOJUN et al., 2009). O último passo da glicólise consiste na conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato, precursor do CAT, em uma reação mediada por piruvato quinase (PK) (NOGUCHI; INOUE; TANAKA, 1986). A mais amplamente expressa isoforma de PK é a muscular que possui duas variantes por *splicing*, PKM1 e PKM2, a primeira é mais eficiente na produção de piruvato, enquanto a segunda é expressa em células em proliferação e em virtualmente todas as células de câncer (CHRISTOFK et al., 2008). A transdução de sinais de proliferação celular inibe a função de PKM2, facilitando o acúmulo dos intermediários glicolíticos para provimento do aminoácido serina. Alinhado com essa observação, a reintrodução de PKM1 compromete a proliferação de células cancerígenas e tumorigênese através da regulação negativa de biossíntese dependente de serina (CHANETON et al., 2012; CHRISTOFK et al., 2008; YE et al., 2012). Coletivamente, a disponibilização de metabólitos intermediários ou dos substratos para o CAT provenientes da glicólise é regulado em múltiplos passos e atende requerimentos energéticos e de produção de biomassa específicos para a demanda celular de células em proliferação.

Em contraste ao conjunto de células proliferativas em um tumor, subpopulações quiescentes são marcadamente menos glicolíticas e mais dependentes da respiração mitocondrial, aqui incluídos o CAT e a fosforilação oxidativa, e estão associadas a um perfil semelhante a célula tronco (LEBLEU et al., 2014; VIALE et al., 2014). A respiração mitocondrial é preferencialmente utilizada para produção de bioenergética celular, mas também provê precursores para biossíntese de macromoléculas. A ativação de PI3K/Akt por fatores de crescimento aumenta a disponibilidade de acetil-CoA, substrato para produção de ácidos graxos *de novo*, através de citrato em acetil-CoA e oxaloacetato pela enzima ATP-citrato liase, codificada pelo gene *ACLY* (BAUER et al., 2005; BERWICK et al., 2002). Outra função estrutural da respiração mitocondrial se refere a produção de aminoácidos não essenciais, sendo especialmente crítica para produção de aspartato e asparagina (BIRSOY et al., 2015; SULLIVAN et al., 2015). Conceitualmente, os requerimentos metabólicos podem ser dicotomizados em provimento de

intermediários para biossíntese de macromoléculas, utilizando preferencialmente a glicólise, ou produção de bioenergia, com a fosforilação oxidativa sendo prioritária.

Assim como em outros modelos de cânceres, as neoplasias mieloides possuem desregulações do metabolismo celular (DEBERARDINIS et al., 2008; HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; WARBURG, 1956). De maneira ilustrativa, a descoberta de mutações nos genes que codificam a isocitrato desidrogenase (*IDH1* e *IDH2*) representaram uma prova de conceito de que a elucidação das anormalidades metabólicas podem ser uma oportunidade terapêutica em neoplasias mieloides. Estas mutações induzem a conversão anormal de α -cetoglutarato (α -CG) em 2-hidroxiglutarato, um oncometabólito que inibe a função de enzimas dependentes de α -CG, tais como as proteínas da família TET (WARD et al., 2010). Como resultado, há alteração do padrão de metilação do DNA, modificações de histonas, inibição da atividade de citocromo C oxidase na cadeia transportadora de elétrons e aumento do requerimento de glutamina pelas células leucêmicas (CHAN et al., 2015; EMADI et al., 2014; FIGUEROA et al., 2010). O tratamento com inibidores de IDH1/2 é capaz de induzir resposta hematológica em pacientes com LMA refratária ou recidivada e promove a diferenciação das células leucêmicas (STEIN et al., 2017; WANG et al., 2013).

O aumento da atividade glicolítica é implicado na leucemogênese induzida pelos oncogenes BCR/ABL1 e MLL/AF9, em que a inibição de PKM2 ou da lactato desidrogenase (LDH) impede o estabelecimento do fenótipo leucêmico (WANG et al., 2014). As células iniciadoras da LMA são dependentes do fluxo glicolítico de maneira dependente de AMPK, cuja inibição resulta na diminuição de absorção de glicose através da expressão reduzida de *GLUT1*, aumento do estresse oxidativo e dano no DNA (SAITO et al., 2015). O aumento da glicólise está também associado a diminuição do fluxo autofágico, maior agressividade em modelos *in vivo* e resistência a drogas (CHEN et al., 2014; SONG et al., 2016; WATSON et al., 2015). Em contrapartida, as células tronco leucêmicas da LMA são dependentes da respiração mitocondrial aeróbica de maneira dependente de BCL2, sugerindo que a inibição desse processo por inibidores de BCL2 pode erradicar seletivamente essa fração de células (LAGADINOU et al., 2013). A inibição da

fosforilação oxidativa com metformina, um hipoglicemiante oral, induziu apoptose de maneira independente de AMPK através da inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (SCOTLAND et al., 2013). Adicionalmente, células de LMA resistentes a citarabina são dependentes da fosforilação oxidativa e a inibição da função mitocondrial amplifica os efeitos antineoplásicos da monoterapia com citarabina (PARDEE et al., 2018). Os requerimentos do metabolismo celular das demais neoplasias mieloides foram menos explorados, especialmente no que se refere as alterações restritas a fração celular fundadora que serve de reservatório para evolução clonal das neoplasias mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas.

1.2.1 Reposicionamento terapêutico da metformina como agente antineoplásico

A metformina (N,N-dimetilbiguanida) é o protótipo farmacológico e tratamento de primeira linha para pacientes com diabetes tipo 2, seu efeito terapêutico é devido a redução da gluconeogênese hepática resultando em aumento da sensibilidade à insulina. Um estudo epidemiológico retrospectivo reportou originalmente a associação entre o uso da metformina para controle da glicemia e redução da incidência de câncer (EVANS et al., 2005). Posteriormente, ficou demonstrado que pacientes com câncer que faziam uso de metformina possuem sobrevida superior aqueles que não utilizavam a droga (DOWLING et al., 2012), e sucedido por uma série de avaliações pré-clínicas que demonstraram os mecanismos da metformina com agente antineoplásico (ALGIRE et al., 2011; BUZZAI et al., 2007; HIRSCH et al., 2009; MEMMOTT et al., 2010; TOMIMOTO et al., 2008). A eficácia da metformina em estudos clínicos prospectivos vem sendo extensamente avaliada com alguns resultados promissores já registrados. Em um estudo clínico de fase II, a combinação de metformina com inibidores de EGFR em pacientes com adenocarcinoma de pulmão aumentou significativamente a sobrevida livre de progressão e sobrevida global (ARRIETA et al., 2019). Metformina também foi eficaz em prolongar a sobrevida global de pacientes com câncer de ovário (BROWN et al., 2020). Os resultados de um estudo clínico canadense que recrutou 3476 mulheres com câncer de mama são

aguardados para o próximo ano, mas os dados preliminares são animadores para o uso adjuvante de metformina (NCT01101438) (GOODWIN et al., 2015).

Existem dois mecanismos mais amplamente aceitos da ação antineoplásica da metformina que não são necessariamente mutuamente exclusivos (BIRSOY; SABATINI; POSSEMATO, 2012). Primeiramente, a metformina reduz os níveis de insulina, um mitógeno importante em alguns tumores. Ambos insulina e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) estimulam a via de sinalização pró-tumorigênica de PI3K/Akt (POLLAK, 2012). Entretanto, este mecanismo só se aplica a tumores que expressam os receptores de insulina e de IGF. O segundo mecanismo proposto se relaciona com a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (EL-MIR et al., 2000; OWEN; DORAN; HALESTRAP, 2000). Estudos *in vivo* posteriores demonstraram que a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons é necessária para a ação antineoplásica da metformina (WHEATON et al., 2014). Demonstrou-se através de análise metabólica de tumores de ovário que a metformina afeta o metabolismo mitocondrial tumoral (LIU et al., 2016). Em câncer de mama, a metformina reduziu a produção de intermediários do CAT (JANZER et al., 2014) e alterou majoritariamente duas vias metabólicas: aumentou a absorção de glicose e a transcrição de genes relacionados a fosforilação oxidativa (LORD et al., 2018).

O tratamento com metformina atenuou significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células tronco hematopoiéticas de camundongos após irradiação total do camundongo, demonstrando que a metformina pode inibir o estresse oxidativo induzido pela radiação. Após o tratamento com a metformina, os camundongos irradiados mostraram recuperação considerável e aumento da capacidade clonogênica das células tronco hematopoiéticas, sem induzir citotoxicidade. Em modelo de transplante secundário competitivo para avaliação das capacidades de enxertia, autorrenovação e diferenciação das CTH após irradiação, o tratamento com metformina aumentou o quimerismo em comparação ao grupo veículo, indicando que a metformina pode preservar a capacidade funcional das CTH após estresse (XU et al., 2015). Quando usada para tratar modelo murino de anemia de Fanconi, em que há falência de medula óssea e risco aumentado de desenvolvimento de leucemia e tumores sólidos, a metformina corrigiu

defeitos na hematopoiese e retardou a formação de tumores. A metformina teve efeito benéfico ao reestabelecer o número de CTH após o nascimento de camundongos portadores de anemia de Fanconi. A administração crônica de metformina aumentou significativamente a frequência e a quiescência de CTH em camundongos adultos (ZHANG et al., 2016). Em LMA, observou-se grande atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* da metformina. A droga reduziu a proliferação, o crescimento de progenitores hematopoiéticos e induziu apoptose *in vitro*. A metformina foi bem tolerada e aumentou significativamente a sobrevivência global em modelo murino xenográfico de LMA (GREEN et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa observou que o uso da metformina apresentou atividade antineoplásica através da inibição da proliferação, atraso da progressão do ciclo celular, redução da capacidade de formação de colônias e indução de apoptose em modelos celulares de NMP JAK2V617F (SET2, HEL e Ba/F3-EPOR). O tratamento com metformina modulou as vias STAT3/5, MAPK e de pRB de maneira AMPK e mTOR independentes. Em modelo murino *knockin* para JAK2V617F, o tratamento foi bem tolerado e reduziu a esplenomegalia e frequência de precursores eritroides no baço, enquanto diminuiu a progressão tumoral em modelo alográfico ortotópico induzido por Ba/F3 (MACHADO-NETO et al., 2018). Entretanto, o potencial curativo da metformina para as NMP não foi avaliado, uma vez que não foi avaliada a ação antineoplásica sobre CTH no estudo original.

1.3 Via de sinalização canônica e não canônica do receptor do fator de crescimento semelhante a insulina e dos substratos do receptor da insulina

As funções fisiológicas e patológicas dos fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGF) são mediadas por seus receptores. Existem dois tipos de receptores de IGF, nomeados receptor tipo 1 (IGF1R) de IGF e tipo 2 (IGF2R). IGF1R é um receptor tirosinoquinase que medeia os efeitos estimulatórios de IGF1 e IGF2 para a proliferação celular, migração e invasão. Em contraste, IGF2R não possui atividade quinase intrínseca e exerce função através da degradação lisossomal de IGF2 (MARIS et al., 2015). O IGF1R consiste em uma subunidade α extracelular e uma subunidade β

transmembrana. Ambas as subunidades α e β são codificadas por um gene localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q26.3). Após tradução do RNA mensageiro de *IGF1R*, forma-se um produto de 210kDa chamado de pro-IGF1R, que, após submetido a clivagem endoproteolítica por convertases pro-proteínas, origina as subunidades (KHATIB et al., 2001). O IGF1R é um heterotetrâmero constituído por duas cadeias α e β (LEROITH et al., 1995). IGF1R possui alta homologia com o receptor de insulina, que possui, por sua vez, duas isoformas InsR-A e InsR-B. A primeira é produto de *splicing* alternativo com remoção do exon 11 no *InsR* (SEINO; BELL, 1989). Enquanto o homodímero de InsR-A é capaz de ligar com alta afinidade tanto a insulina quanto ao IGF2, o homodímero de InsR-B ou o heterodímero de InsR-A/B não é capaz de ligar-se a IGF. Há ainda associação entre IGF1R e InsR-A/B, com capacidade de ligação a IGF1 e IGF2 (SEINO; BELL, 1989; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

A associação de IGF a seu receptor induz mudanças conformacionais que resultam na abolição das restrições da atividade quinase por seu ectodomínio, conduzindo a transfosforilação de seus domínios quinases (LIU; RUTTER; WANG, 1993). A fosforilação do domínio triplo-tirosina 1131, 1135 e 1136 da subunidade β amplifica a atividade quinase de IGF1R (LEE et al., 2018; TAHIMIC et al., 2016). As alterações conformacionais criam sítios de ancoragem para proteínas adaptadoras, tais como Shc e os substratos do receptor de insulina (IRS), que retransmitem a sinalização para vias efetoras (DE MEYTS; SHYMKO, 2000). Como resultado, a ativação de IGF1R fosforila IRS1/2 em resíduos tirosina promovendo sua associação e amplificando a ativação de PI3K e PDK1. A ativação total de Akt mediada pela fosforilação dos sítios treonina 308 e serina 473, por PDK1 e mTORC2, respectivamente, é responsável pelo metabolismo de glicose, síntese proteica, proliferação e sobrevivência celular e inibição da apoptose (HUA et al., 2019). A ativação da via de sinalização de Ras-Raf-MEK-ERK (MAPK) é um efetor importante para controle da proliferação celular mediado por IGF1R em um processo dependente de Grb2 e SOS (QIN et al., 2019).

As funções canônicas desempenhadas por IGF1R são dependentes de sua localização na membrana plasmática, entretanto, em determinadas condições, tais como câncer, o receptor pode ser translocado para o

citoplasma ou núcleo (ALEKSIC et al., 2010a; ASLAM et al., 2013; ASMANE et al., 2012). Este processo é dependente da SUMOilação de um resíduo conservado entre espécies de lisina nas posições 1025, 1100 e 1120 e da enzima Ubc9 (DENG et al., 2011; SEHAT et al., 2010). Quando no núcleo, o IGF1R é capaz de ligar-se não apenas ao próprio promotor (SARFSTEIN et al., 2012), mas também de recrutar a RNA polimerase II e induzir a expressão dos fatores de transcrição *JUN* e *FAM21* (ALEKSIC et al., 2018). A interação com fator de célula T, IGF1R promove a expressão de ciclina D1 e outros alvos de β -catenina (WARSITO et al., 2012). A atividade tirosinoquinase de IGF1R é conservada após sua translocação ao núcleo. Como exemplos, IGF1R fosforila os resíduos tirosina 60, 130 e 250 de PCNA, induzindo ubiquitinação e degradação proteossomal, e prevenindo a replicação do DNA após dano (WARAKY et al., 2017) e é capaz de fosforilar histonas para regulação da expressão gênica (WARSITO et al., 2016).

A expressão de IGF1R é frequentemente aumentada em diversos tipos de câncer. Em aproximadamente 50% dos casos de câncer de mama há aumento da expressão da atividade de IGF1R, especialmente o luminal tipo-A sendo raro nos luminais tipo B e triplo negativos (FARABAUGH; BOONE; LEE, 2015). O aumento da expressão ou da ativação da via de IGF1R identifica pacientes com prognóstico desfavorável em câncer de mama (CREIGHTON et al., 2008; LAW et al., 2008; PEIRÓ et al., 2011; YERUSHALMI et al., 2012). Digno de nota, a assinatura molecular de ativação de IGF1R é associado com prognóstico desfavorável em câncer de mama (CREIGHTON et al., 2008). Similarmente, a expressão de IGF1R é aumentada em 1/3 dos pacientes com câncer de próstata e carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, e está associada com aumento do risco de recidiva, metástase, estágio avançado e sobrevida global inferior (ALEKSIC et al., 2017; DALE et al., 2015).

A identificação de IGF1R como proteína importante para promoção de diversos tipos de câncer estimulou o desenvolvimento de agentes direcionados para sua inibição, com destaque para os anticorpos monoclonais e inibidores seletivos, muitos desses compostos já foram testados em ensaios clínicos. Entretanto, a maior parte dos ensaios com anticorpos monoclonais falhou quando utilizando em monoterapia e em pacientes não selecionados

(RAMALINGAM et al., 2011; SCLAFANI et al., 2015). Em uma meta-análise que incluiu 311 pacientes com sarcoma de Ewing tratados com os anticorpos anti-IGF1R figitumumabe ou ganitumabe determinou uma taxa de resposta completa de 0,7%, respostas parciais em 11% e doença estável em 21% dos casos (VAN MALDEGEM et al., 2016). O ganitumabe foi aprovado como droga órfã para tratamento de pacientes com sarcoma de Ewing pela agência reguladora dos Estados Unidos da América em 2017. Como estratégia alternativa, foram desenvolvidos anticorpos monoclonais para IGF1 e IGF2, com resultados de estudos clínicos de fase 2/3 aguardados para os próximos anos (HALUSKA et al., 2014; IGUCHI et al., 2015).

Diversos inibidores farmacológicos de IGF1R foram produzidos, sendo o mais extensivamente estudado o linsitinibe, um inibidor seletivo de IGF1R-InsR (AIKEN et al., 2017; BARATA et al., 2018; BENDELL et al., 2015; CHIAPPORI et al., 2016; FASSNACHT et al., 2015; VON MEHREN et al., 2020). Linsitinibe não foi eficaz no tratamento de pacientes com câncer de pulmão de células pequenas, com eficiência terapêutica inferior a quimioterápicos utilizados na prática clínica, tais como inibidores de topoisomerase (topotecan) (CHIAPPORI et al., 2016). Linsitinibe também não demonstrou atividade clínica em pacientes com câncer de próstata ou carcinoma adrenocortical (BARATA et al., 2018; FASSNACHT et al., 2015). Os resultados de estudos clínicos testando as combinações de linsitinibe com o inibidor de mTOR everolimus, em pacientes com câncer colorretal, e o inibidor tirosinoquinase de EGFR erlotinibe, para pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas foram frustrantes (BARATA et al., 2018; BENDELL et al., 2015).

Conforme descrito anteriormente, os efeitos celulares da insulina e IGF são intermediados por proteínas citoplasmáticas que iniciam vias de sinalização, sendo conhecidos ao menos nove substratos dos receptores de InsR e IGF1R. Quatro desses substratos compõem a família de proteínas IRS (LAVAN; LANE; LIENHARD, 1997; SUN et al., 1991, 1995). Outros substratos diretos incluem Gab-1, DOK1, Cbl, SH2B2, SHP2 e várias isoformas de Shc, cada substrato é responsável pela ativação de uma via (BAUMANN et al., 2000; GUSTAFSON et al., 1995; LECHLEIDER; FREEMAN; NEEL, 1993; LEHR et al., 2000; LIU et al., 2002; WICK et al., 2001). Cada substrato é

fosforilado em resíduos tirosina em sequências motivo específicas, e então ancoram proteínas que possuem domínios SH2 (SALTIEL; KAHN, 2001). Os domínios conservados entre os substratos são o domínio de ligação a fosfotirosina (PTB) que os liga a sítios de autofosforilação juxtamembrana dos receptores (LIU et al., 2002, 2003).

A fosforilação de proteínas IRS mediada por InsR e IGF1R ocorre em ao menos 9 domínios tirosina que reconhecem e ativam PI3K e proteínas quinases efetoras. Ambas IRS1 e IRS2 são amplamente expressos, enquanto a expressão de IRS3 e IRS4 é limitada a tecidos específicos (MYERS; WHITE, 1995). Apesar da elevada homologia e semelhanças nos domínios funcionais, estudos com modelos animais nocautes sugerem funções complementares para IRS1 e IRS2. Animais nocautes para IRS1 retardo do crescimento pré- e pós-natal devido a resistência a IGF1, assim como resistência à insulina e comprometimento do metabolismo da glicose no tecido muscular e adiposo (ARAKI et al., 1994; YAMAUCHI et al., 1996). Animais nocaute para IRS2 possuem resistência hepática a insulina, defeitos no desenvolvimento do cérebro, células β pancreáticas e retinas (WITHERS et al., 1998). As proteínas IRS também podem ser fosforiladas em resíduos serina, estando geralmente associada com redução da ação da insulina (ZICK, 2005) por meio da redução da fosforilação dos domínios tirosina e da interação com proteínas 14-3-3 (CRAPARO; FREUND; GUSTAFSON, 1997). Diversas quinases intracelulares são implicadas a esse processo, entre as Akt, JNK, ERK e PI3K, em um mecanismo de regulação negativa retroalimentado (BIRNBAUM, 2001; DE FEA; ROTH, 1997; HIROSUMI et al., 2002; LI; DEFEA; ROTH, 1999; SAMUEL; SHULMAN, 2012; TANTI et al., 1994).

Dados de nosso grupo de pesquisa identificaram que *IRS2* é a isoforma mais abundante em células progenitoras hematopoiéticas CD34+, enquanto *IRS1* é mais abundante em linfócitos T. Em camundongos, a *Lrs2* é a isoforma predominante no tecido hematopoiético (SUN et al., 1995, 1997). A diferenciação eritroide, granulocítica e megacariocítica aumenta a expressão de *IRS2 in vitro* (MACHADO-NETO et al., 2012). Os receptores de eritropoietina e trombopoietina são capazes de ativar IRS2, e a ativação de IGF1R é relevante para a diferenciação granulocítica e eritroide (KURTZ et al., 1988; MERCHAV; LAKE; SKOTTNER, 1993; MIYAKAWA et al., 2001;

SCHACHER et al., 2000; VERDIER et al., 1997). Após estímulo com as interleucinas (IL) 2, IL4, IL7 e IL15, ambas IRS1 e IRS2 são fosforiladas em resíduos tirosina (JOHNSTON et al., 1995). Coletivamente, as proteínas IRS exercem função relevante na mediação do processo fisiológico de hematopoiese.

Em células K562, uma linhagem derivada de paciente com leucemia BCR/ABL1, nosso grupo de pesquisa previamente demonstrou que IRS1 está constitutivamente fosforilada e associada com BCR-ABL1; IRS1 é capaz de associar-se a GRB2 e ativar ERK. O silenciamento de IRS1 reduziu a proliferação celular e inibiu a via PI3K/Akt/mTOR e MAPK (MACHADO-NETO et al., 2011; TRAINA et al., 2003). Em outro trabalho, nosso grupo de pesquisa observou que a expressão gênica de *IRS2* é maior em células CD34+ de sangue periférico de pacientes portadores da mutação JAK2V617F em relação àqueles detentores de JAK2 selvagem. Foi descrita também a associação entre IRS2 e JAK2 em linhagem celular com a mutação JAK2V617 (HEL), mas não em linhagens JAK2 selvagem (U937 e NB4) (CAMPOS et al., 2016). Em células HEL, o silenciamento de IRS2 foi suficiente para diminuir a fosforilação de STAT5, viabilidade celular, capacidade clonogênica e aumentar as taxas de apoptose, além de apresentar efeito cumulativo ao tratamento com inibidor seletivo de JAK1/2 ruxolitinibe (CAMPOS et al., 2016).

Em 2013 foram desenvolvidos inibidores farmacológicos com objetivo de degradarem as proteínas IRS1/2 seletivamente, sendo o NT157, ou Tyrphostin, o mais promissor em modelo celular de melanoma. O processo farmacológico inicialmente descrito descreveu que NT157 dissocia as proteínas IRS1/2 do IGF1R deslocando-as para o citoplasma e induzindo fosforilação em resíduos serina. Adicionalmente, a ativação de ERK1/2, viabilizada pela associação de Shc com IGF1R, ativaria um eixo de regulação negativa de IRS1/2 através da ubiquitinação e posterior degradação proteossomal (REUVENI et al., 2013). A oportunidade terapêutica do NT157 foi avaliada em modelos pré-clínicos de câncer de cólon, hepatocarcinoma, câncer de próstata e sarcoma de Ewing com resultados animadores (IBUKI et al., 2014; REUVENI et al., 2013; SANCHEZ-LOPEZ et al., 2016). Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado à avaliação pré-clínica de NT157 em modelos de neoplasias hematológicas. O tratamento com NT157 foi citotóxico e reduziu

a viabilidade celular, a proliferação, induziu apoptose e alterou a progressão do ciclo celular em diferentes modelos que incluem neoplasia mieloproliferativa associada a mutação em JAK2V617F e leucemia associada ao oncogene BCR/ABL1. Em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda B e T, NT157 foi também citotóxico e mais eficiente que o inibidor farmacológico de IGF1R/InsR linsitinibe. Molecularmente, o tratamento com NT157 inibiu a via de sinalização de PI3K de maneira consistente em todos os modelos testados (FENERICH et al., 2020; RODRIGUES ALVES et al., 2019; SCOPIM-RIBEIRO et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar novos preditores clínicos e oportunidades terapêuticas para metformina e inibidores farmacológicos de IGF1R-IRS1/2 em neoplasias mieloides.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em modelo murino de neoplasia mieloproliferativas *knockin* para JAK2V617F:

- Avaliar a eficácia terapêutica de metformina quanto a modulação do fenótipo clínico, distribuição e efeitos moleculares em progenitores hematopoiéticos em NMP murina;

Em uma coorte de pacientes com síndromes mielodisplásicas:

- Identificar genes relacionados a energética celular diferencialmente expressos entre células CD34+ de pacientes com SMD e indivíduos saudáveis;

- Elaborar um índice prognóstico baseado em expressão gênica que refine a estratificação de risco para pacientes com SMD;

- Investigar os mecanismos moleculares relacionados ao índice prognóstico.

Em coortes de pacientes com leucemia mieloide aguda:

- Investigar a expressão gênica de IGF1R e IGF2R em LPA;

- Investigar a expressão gênica e os mecanismos moleculares associados a expressão de IGF1R, IGF2R, IRS1 e IRS2 em LMA não LPA.

Em modelos celulares de leucemia mieloide aguda:

- Avaliar os efeitos citotóxicos dos inibidores farmacológicos de IGF1R-IRS1/2 linsitinibe e NT157;

- Investigar as vias de sinalização moduladas pelos inibidores linsitinibe e NT157;

- Investigar as vias de sinalização reguladas pelos inibidores farmacológicos de FLT3 midostaurin e quizartinibe;
- Investigar os efeitos citotóxicos combinados dos inibidores de IGF1R-IRS1/2 linsitinibe ou NT157 e inibidores farmacológicos de FLT3;

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os principais métodos aplicados a cada etapa de desenvolvimento da presente tese estão sumarizados no quadro 1.

Quadro 1: Organograma dos planejamentos experimentais dos projetos desenvolvidos

Ensaio <i>in vivo</i> tratamento de modelo murino com metformina			
Linhas murinas	Drogas	Ensaio funcional e molecular	Fenótipo
C57Bl6/J: transgênico com expressão de Jak2V617F e Cre recombinase Camundongo Pep/Boy	Metformina: 125mg/kg/dia via intraperitoneal	Clonogenicidade PCR-Array	Citometria de fluxo para progenitores eritroides e células tronco e progenitoras hematopoiéticas Hemograma Peso do baço

Dados clínicos			
Coortes	Drogas	Ensaio molecular	Desfechos clínicos
IC-APL SMD: GSE58831 LMA: TCGA	Reguladores do metabolismo celular IGF1R e IGF2R IRS1 e IRS2	Análise de enriquecimento gênico	Expressão gênica diferencial Poder preditivo

Ensaio <i>in vitro</i> linhagens celulares			
Linhas celulares	Drogas	Ensaio funcionais	Expressão e ativação proteica
NB4 NB4-R2 Kasumi-1 THP1 Molm13 MV4;11	Linsitinibe: 1, 2,5, 5, 10, 20 e 40 µM NT157: 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 µM Midostaurin: 2,5, 5 e 10 nM Quizartinib: 0,5, 1 e 2 nM	Viabilidade celular Apoptose (AnexinaV/PI) Autofagia: laranja de acridina Metabolismo mitocondrial: DCFDA, Mitotracker, JC-1 e mitosox	Western blotting

Notas: IC-APL: consórcio internacional de Leucemia Promielocítica Aguda; SMD: síndrome mielodisplásica; LMA: Leucemia Mieloide Aguda; TCGA: O Atlas do Genoma do Câncer; PI: iodeto de propídeo e DCFDA: Diacetato de diclorofluoresceína.

3.1 Estabelecimento de modelo murino de neoplasia mieloproliferativa para tratamento com metformina

O modelo murino transgênico de expressão condicionada e fisiológica da mutação Jak2V617F foi estabelecido pelo grupo de pesquisa de Dr.

Benjamin Ebert do Brigham and Womens Hospital e do Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School e estabelecido em nossa instituição pela Prof^a. Dr^a. Lorena Lobo de Figueiredo Pontes. Neste modelo, a expressão de Jak2 é regulada por seu promotor endógeno e condicionada a presença da enzima *Cre*-recombinase (MULLALLY et al., 2010). Todos os experimentos realizados foram revisados e autorizados pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA/FMRP: protocolo 02/2016; Anexo A).

Cinco milhões de células totais da medula óssea obtidas do camundongo *knockin* para mutação Jak2V617F (CD45.2; Jak2WT/V617F) foram transplantadas em camundongos PepBoy fêmeas (CD45.1; B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ, The Jackson Laboratory, EUA) letalmente irradiados com 700 cGy de raios X. Após o transplante foi realizada antibioticoterapia profilática com enrofloxacino 5mg/kg/dia por 5 dias. O quimerismo foi determinado em sangue periférico através da marcação dos leucócitos com anticorpos FITC-CD45.1 e PE-CD45.2 (BD, EUA). Os animais foram dicotomizados para os grupos veículo (n=6; PBS) ou metformina (n=4; 125mg/kg/dia) segundo peso e quimerismo após oito semanas do transplante e tratados diariamente durante 6 semanas por via intraperitoneal.

Na conclusão do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestesia com cetamina (300mg/kg) e xilazina (30mg/kg) e avaliados quanto ao comprometimento orgânico de baço e medula óssea (MO), frequência de precursores hematopoiéticos no baço e medula óssea por citometria de fluxo que incluíram (CHALLEN et al., 2009):

- Progenitores eritroides (CD71/Ter119);
- Células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (CTPH) LSK: Lin⁻Sca-1⁺c-Kit^{Hi}
- CTPH de longo prazo [LT-HSC]: LSKCD48⁻CD150⁺
- CTPH de curto prazo [ST-HSC]: LSKCD48⁺CD150⁺
- Progenitores multipotentes [MPP]: LSKCD48⁺CD150⁻
- Progenitores mieloides LK: Lin⁻Sca-1⁻c-Kit^{Hi}
- Progenitor mielo-eritroide (MEP): LK CD34⁻CD16/32⁻
- progenitor mieloide comum (CMP): LK CD34⁺CD16/32⁻
- progenitores granulocíticos (GMP): LK CD34⁺CD16/32⁺

A capacidade de formação de colônias *ex vivo* foi determinada através do ensaio clonogênico em metilcelulose (MethoCult™ GF M3434, Stem Cell Tech), no qual foram utilizadas 5000 células mononucleares da medula óssea dos animais tratados com metformina ou veículo. Após 10 dias de cultivo, as colônias foram contadas e identificadas segundo critérios morfológicos padronizados (KRONSTEIN-WIEDEMANN; TONN, 2019).

A interrogação de vias celulares desreguladas nos progenitores hematopoiéticos pelo tratamento com metformina foi determinada em células c-Kit enriquecidas por separação imunomagnética em equipamento autoMACS (Miltenyi Biotec, Alemanha) e avaliadas por PCR-Array para ciclo celular e apoptose (PAMM-020Z e PAMM-012Z, respectivamente) (Qiagen, EUA). A extração do ácido ribonucleico (RNA) foi realizada utilizando o reagente TRIzol LS (Ambion, EUA). A síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar de dupla fita utilizou o sistema do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA). As reações de PCR-Array foram realizadas segundo preconizado pela fabricante e as análises realizadas no ambiente virtual GeneGlobe (Qiagen, EUA).

3.2 Casuística e protocolo de tratamento

O diagnóstico de LMA foi realizado segundo preconizado pela Organização Mundial da Saúde (SWERDLOW et al., 2017). Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos através da análise do prontuário médico e o risco citogenético para pacientes com LMA foi realizado segundo sugerido pelo European LeukemiaNET (DÖHNER et al., 2017) e o risco de recaída para pacientes com leucemia promielocítica aguda (LPA) segundo o PETHEMA-GIMEMA(SANZ et al., 2000). Amostras de cinco pacientes com LMA foram utilizadas para avaliação da eficiência terapêutica de Linsitinibe *ex vivo* (CAAE: 40325820.0.0000.5440; Anexo B). Para tanto, células mononucleares da medula óssea foram utilizadas para determinação da viabilidade (ensaio de MTT) e apoptose (através de coloração com Anexina V/PI).

A expressão gênica de *IGF1R* e de *IGF2R* foi avaliada utilizando a coorte do estudo clínico do consórcio internacional em leucemia promielocítica aguda (IC-APL; n=105) (CAAE: 819878.5.1001.5440; Anexo C). Neste estudo foram incluídos pacientes diagnosticados com LPA entre fevereiro de 2002 a

setembro de 2010 (REGO et al., 2013). O material escolhido para análise foi amostras de medula óssea. O diagnóstico de LPA foi baseada na detecção do padrão característico de microspeckled por meio da técnica de imunofluorescência. A análise citogenética de t(15; 17) e/ou RT-PCR para o gene de fusão PML-RAR α foi obrigatório para confirmação do diagnóstico. O diagnóstico molecular foi realizado pelo Serviço de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Uma vez confirmado o diagnóstico, os pacientes foram classificados de acordo com o risco de recaída da doença, o qual leva em consideração contagens de leucócitos e plaquetas no sangue periférico no momento do diagnóstico. Resumidamente, os pacientes foram classificados como sendo de baixo risco de recaída se a contagem de leucócitos fosse abaixo $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e plaquetas acima de $40 \times 10^3/\mu\text{L}$, como sendo de risco intermediário, quando apresentava contagem de leucócitos abaixo de $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e plaquetas abaixo de $40 \times 10^3/\mu\text{L}$, e pacientes com alto risco de recaída quando apresentavam contagem de leucócitos acima de $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ (SANZ et al., 2000).

As coortes do atlas do genoma do câncer de LMA (TCGA, 2013) e de uma coorte europeia de pacientes adultos com LMA (DE JONGE et al., 2010; VERHAAK et al., 2009) foram utilizadas para determinar a expressão gênica diferencial e o impacto prognóstico de IGF1R, IGF2R, IRS1 e IRS2. Os dados podem ser acessados no portal CBio para genômica do câncer (CERAMI et al., 2012) e no repositório de expressão gênica do Centro Nacional para informação em Biotecnologia (GEO-NCBI) sob o registro GSE-6891. Uma coorte adicional que inclui dados transcriptômicos de células CD34+ de pacientes com SMD e indivíduos saudáveis foi obtida no GEO-NCBI, registrado como GSE-58831 (GERSTUNG et al., 2015). Todos os dados depositados em plataformas são de uso livre desde que citada a fonte.

3.3 Proposição de um índice prognóstico baseado em expressão gênica para pacientes com síndrome mielodisplásica

3.3.1 Análise transcriptômica de células CD34 de pacientes com SMD

Os dados de expressão gênica obtidos pelo método de microarranjo estão depositados no GEO-NCBI sob o seguinte registro GSE58831. A normalização da expressão foi realizada utilizando uma abordagem de

múltiplos chips e relativa a genes endógenos (IRIZARRY et al., 2003). Foram selecionados genes que participam dos processos de glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e fosforilação oxidativa para interrogar a expressão gênica diferencial entre pacientes com SMD e a capacidade preditiva quanto a sobrevida global. A tabela 1 contém os genes selecionados para desenho do índice baseado em expressão gênica. Genes cujos valores de expressão não foram suficientes para serem detectados pelo método foram excluídos. Ademais, genes com mais de um transcrito quantificado foram avaliados segundo a mediana de expressão.

Tabela 1. Lista dos genes selecionados para proposição de um índice prognóstico baseado em expressão gênica e para expressão gênica diferencial entre pacientes com síndrome mielodisplásica e indivíduos saudáveis.

<i>ABAT</i>	<i>ACLY</i>	<i>ANPEP</i>	<i>CAT</i>	<i>CS</i>	<i>DPYPD</i>	<i>ERCC2</i>	<i>FASN</i>	<i>GAD1</i>
<i>GGCT</i>	<i>GOT2</i>	<i>GPX1</i>	<i>GSR</i>	<i>GSS</i>	<i>GSTM1</i>	<i>HK1</i>	<i>HK2</i>	<i>IDH1</i>
<i>IDH2</i>	<i>IDH3A</i>	<i>IDH3B</i>	<i>IDH3G</i>	<i>LDHA</i>	<i>LDHB</i>	<i>MDH2</i>	<i>ME1</i>	<i>OGDH</i>
<i>PANK1</i>	<i>PFKL</i>	<i>PFKP</i>	<i>PKM</i>	<i>PKMYT1</i>	<i>SCD</i>	<i>SDHA</i>	<i>SLC25A5</i>	<i>TALDO1</i>

3.3.2 Modelagem do índice prognóstico

Para determinação da função prognóstica dos genes individualmente, utilizou-se inicialmente o pacote “cutpointr” para o programa R, através do qual se determinou os pontos de dicotomização para cada gene e os respectivos valores da curva de características operacionais do receptor (ROC) e estatística C. Após dicotomização, a capacidade preditiva de cada gene foi determinada utilizando os modelos univariado e multivariado de riscos proporcionais de Cox utilizando idade, sexo e estratificação de risco do IPSS-R como confundidores. Os genes independentemente associados a sobrevida global foram selecionados para o índice prognóstico, sendo computado o valor “um” para cada fator de risco apresentado. Os grupos do índice proposto foram determinados por inspeção por Kaplan-Meier.

3.4 Linhagens celulares

Todas as linhagens celulares e os respectivos meios de cultivo estão listados na tabela 2. Todas as linhagens foram autenticadas por genotipagem de regiões microssatélites seguida de análise de fragmentos e testadas continuamente para a presença de *Mycoplasma sp.* (MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit; Lonza, EUA). A linhagem Molm13 foi cedida pelo

professor Jürg Schwaller do departamento de biomedicina da Universidade da Basileia. Todas as demais foram adquiridas na ATCC (EUA).

Tabela 2: Linhagens celulares utilizadas e meios de cultivo

Linhagem	Espécie	Característica	Meio de cultivo
NB4	<i>Homo sapiens</i>	LPA com t(15;17)	RPMI 10% SFB
NB4-R2	<i>Homo sapiens</i>	LPA com t(15;17)	RPMI 10% SFB
Kasumi-1	<i>Homo sapiens</i>	LMA com t(8;21) e mutação em Kit	RPMI 20% SFB
THP1	<i>Homo sapiens</i>	LMA com expressão truncada de <i>TP53</i>	RPMI 10% SFB*
Molm13	<i>Homo sapiens</i>	LMA com mutação em FLT3	RPMI 10% SFB
MV4;11	<i>Homo sapiens</i>	LMA com mutação em FLT3	IMDM 10%SFB

Abreviações: LPA: Leucemia Promielocítica Aguda; LMA: Leucemia Mieloide Aguda; RPMI: Roswell Park Memorial Institute; IMDM: Meio Dulbecco modificado por Iscove; SFB: Soro Fetal Bovino.

* adição de 0,05mM de β -mercaptoetanol.

3.5 Reagentes químicos

3.5.1 Meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e IMDM (Meio Dulbecco modificado por Iscove) foram adquiridos da Gibco (EUA). Ao meio de cultivo foi adicionado 1% da solução com os antibióticos penicilina e estreptomicina 10000U/mL (Gibco, EUA). Conforme descrito na tabela 2, os meios foram suplementados com concentrações específicas de soro fetal bovino (Vitrocell, Brasil). As células primárias de pacientes com LMA foram cultivadas em meio MEM (meio mínimo essencial) α suplementado com 15% de SFB e as seguintes citocinas: fator de célula tronco (SCF; 100ng/mL), interleucina 3 (IL3; 10ng/mL), IL6 (20n/mL), trombopoietina (TPO; 10ng/mL) e FLT3-ligante (FLT3-L; 10ng/mL) (TYNER et al., 2013). Todas as citocinas foram adquiridas da PeproTech (EUA).

3.5.2 Compostos

A metformina utilizada para o tratamento do modelo de NMP JAK2V617F foi adquirida da empresa Merck (hidroclorato de 1,1-dimetilbiguanida, Alemanha) e constitui-se do mesmo composto utilizado no medicamento Glifage (Merck). Para o tratamento, a metformina foi diluída em PBS estéril e administrada diariamente via intraperitoneal na dose de 125mg/kg.

Os inibidores de IGF1R-IRS1/2 foram adquiridos da MedChem Express (França) para o linsitinibe e da SunChine Chemical Technology (China) para o NT157. Ambos foram diluídos em DMSO para os ensaios funcionais e moleculares. Os inibidores farmacológicos de FLT3 midostaurin e quizartinibe foram adquiridos da MedChem Express (França) e diluídos em DMSO. O inibidor farmacológico de autofagia cloroquina foi adquirida da Sigma-Aldrich (Reino Unido) e diluída em PBS estéril. A concentração final de cada composto está indicada nas figuras correspondentes e a concentração final de DMSO em cultura não superou 0,5%.

3.6 Ensaios funcionais

As linhagens celulares ou células mononucleares de medula óssea de pacientes com LMA foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade detalhados a seguir.

3.6.1 Avaliação da viabilidade celular

Este método foi utilizado para as linhagens celulares contidas na tabela 2 quanto para as células primárias dos pacientes com LMA. As células foram cultivadas em placas de 96 poços em confluências específicas para as linhagens (10000/100µL) e para as células primárias (100000/100µL). Após incubação por 24, 48 ou 72 horas a 37°C, adicionou-se 50 µg do reagente metiltiazoltetrazólio (MTT) e as células foram incubadas a 37°C por 4 horas. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de 0,1N HCl em isopropanol. A viabilidade foi avaliada pela mensuração da absorbância a 570 nm, utilizando um leitor automático de placas (BioRad, EUA). Para as linhagens celulares, cada condição foi testada com ao menos três réplicas técnicas e 6 réplicas biológicas, enquanto para as células primárias os experimentos foram realizados com três réplicas técnicas.

3.6.2 Avaliação da apoptose celular através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo

O estudo da apoptose foi realizado através da marcação das células com anexina V (annexin V-FITC ou APC/BD PharMingen, CA, EUA) e iodeto de propídeo (Propidium Iodide[PI]/Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Utilizando-se placa de 24 poços, 2×10^5 células foram

plaqueadas por poço em meio apropriado para cada linhagem celular. As amostras foram incubadas por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente e analisadas em equipamento FACSCalibur (BD Bioscience). Para cada amostra, foram adquiridos 10000 eventos. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) e analisados com o programa FlowJo (Treestar). As células positivas para anexina V, em relação ao número total de células, indicam células em processo de morte celular programada.

3.6.3 Avaliação da autofagia por citometria de fluxo

A determinação de presença do processo de autofagia foi realizada segundo metodologia proposta por Thomé e colaboradores (THOME et al., 2016). Brevemente, utilizamos a sonda celular de livre-permeabilização laranja de acridina que possui mudança metacromática em condições com redução de pH. O fluxo autofágico foi determinado pela quantificação da razão de fluorescência de vermelho para verde.

3.6.4 Avaliação dos efeitos citotóxicos na função mitocondrial

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) total (DCFDA, Thermo scientific, EUA), ERO mitocondrial (mitosox, Thermo scientific, EUA), massa mitocondrial (mitotracker, Thermo scientific, EUA) e polarização mitocondrial (coloração com JC-1, Thermo scientific, EUA) foi determinada por citometria de fluxo.

3.7 Western blotting

Ao precipitado celular contendo entre 5×10^6 e 10×10^6 de células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7,6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 35 mg fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 60 a 120 minutos a 4°C . Após esse período, as amostras foram centrifugadas a $12000 \times g$, 4°C durante 20 minutos. Ao produto do extrato proteico total, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotreitól, 10% de dodecilsulfato de sódio (SDS) e azul de bromofenol. As amostras foram armazenadas a -80°C . O extrato proteico foi submetido à

eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5 a 15% em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, EUA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 120 minutos a 120V em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado sem açúcar, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0,02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (3% leite em pó desnatado sem açúcar) por 12 horas a 4°C sob agitação e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0,02% Tween 20). O sistema de revelação usado foi baseado em quimioluminescência, utilizando-se o kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate System (Thermo Fisher Scientific) e Gel Doc XR+ system (Bio-Rad). Os anticorpos utilizados estão listados na tabela 3. A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão das proteínas endógenas actina, tubulina ou GAPDH, e a intensidade das modificações pós traducionais, através da intensidade da banda da proteína total correspondente. As imagens finais foram elaboradas a partir das porções do gel que contêm as bandas de interesse.

Tabela 3: Lista de anticorpos utilizados

Empresa	Alvo	Espécie	Catálogo	Diluição
Cell signaling	p-IGF1R ^{Tyr1135}	Coelho	3918	1:1000
	IGF1R	Coelho	9750	1:2000
	IRS1	Coelho	3407	1:2000
	IRS2	Coelho	3089	1:2000
	p-mTOR ^{Ser2448}	Coelho	5536	1:4000
	mTOR	Coelho	2983	1:4000
	p-Akt ^{Ser473}	Coelho	4060	1:2000
	Akt (Pan)	Coelho	4691	1:2000
	p-4E-BP1 ^{Thr70}	Coelho	9455	1:4000
	4E-BP1	Coelho	9644	1:4000
	p-P44/42 ^{Thr202/Tyr204}	Coelho	4370	1:2000
	P44/42	Coelho	4695	1:2000
	SQSTM1/p62	Coelho	23214	1:1000
	Beclin-1	Camundongo	4122	1:2000
	LC3B	Coelho	3868	1:2000
	Caspase 3	Coelho	9662	1:2000
	p-P38 MAPK ^{Thr180/Tyr182}	Coelho	4511	1:2000
	P38 MAPK	Coelho	8690	1:2000
	p-SAPK/JNK ^{Thr183/Tyr185}	Coelho	9255	1:2000
	SAPK/JNK	Coelho	9252	1:2000
	p-FLT3 ^{Tyr591}	Coelho	3474	1:1000
	FLT3	Coelho	3462	1:2000
	p-STAT5 ^{Tyr694}	Coelho	4322	1:2000
	STAT5	Coelho	94205	1:2000
	p-Raptor ^{Ser792}	Coelho	2083	1:1000
	Raptor	Coelho	2280	1:1000
	p-Rictor ^{Thr1135}	Coelho	3806	1:1000
	Rictor	Coelho	2114	1:1000
	p-ULK1 ^{Ser757}	Coelho	14202	1:1000
	ULK1	Coelho	8054	1:2000
	BCL-X _L	Coelho	2762	1:4000
	ATG13	Coelho	13468	1:2000
	PARP	Coelho	9542	1:4000
GAPDH	Coelho	2118	1:4000	
Santa Cruz				
Biotechnology	p-IRS1/2 ^{Tyr612}	Coelho	SC-17195	1:250
	p-P70S6K ^{Thr421/Ser424}	Coelho	SC-7984	1:2000
	P70S6K	Camundongo	SC-8418	1:2000
	p-H2A.X ^{Ser139}	Camundongo	SC-517648	1:4000
	Tubulin	Camundongo	SC-5286	1:4000
Thermo Fischer	p-ERK1/2 ^{Thr185/Tyr187}	Coelho	44-680G	1:2000
	ERK1/2	Coelho	61-7400	1:2000
Sigma	BCL-2	Camundongo	087K4776	1:5000
	α-Tubulin	Camundongo	118K4780	1:10000
Novus biologicals	B-Actina	Camundongo	NB600-501H	1:5000
Abcam	p-IRS1/2 ^{Ser1101/1149}	Coelho	ab178703	1:2000
	p-IRS1 ^{Tyr632}	Coelho	ab109543	1:2000
	p-IRS2 ^{Ser731}	Coelho	ab3690	1:1000

3.8 Análise de enriquecimento de conjuntos gênicos

Os fenótipos utilizados para comparação transcriptômica foi a dicotomização da expressão gênica de *IGF1R*, *IGF2R*, *IRS1* e *IRS2* para os pacientes com LMA e as entidades de risco do índice prognóstico proposto para SMD. A análise de enriquecimento de processos biológicos e moleculares significativamente associados aos fenótipos comparados foi realizada com auxílio do programa GSEA v4.0.3 (*Gene Set Enrichment Analysis*, Instituto Broad, EUA) (SUBRAMANIAN et al., 2005). Foram utilizadas as seguintes bibliotecas de processos curadas pelo instituto Broad MSigDB: Reactome, KEGG e *Hallmarks*, utilizando 1000 permutações para cálculo do valor de P, índice de enriquecimento normalizado (NES) e razão de falsa descoberta FDR. Os valores de $P < 0,05$ e $FDR < 0,25$ foram considerados significativo.

3.9 Análise dos dados

As análises descritivas foram realizadas para os dados clínicos dos pacientes utilizando teste exato de Fischer ou teste de Chi-quadrado para comparação das proporções entre variáveis categóricas e os testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis para as variáveis contínuas. O teste de independência entre covariáveis foi realizado utilizando o modelo de risco proporcionais de Cox. A capacidade preditiva para o desfecho sobrevida global de cada variável interrogada foi determinada utilizando curva ROC e a respectiva estatística C. A comparação direta entre o poder preditivo de covariáveis foi determinada através das diferenças entre as áreas sobre a curva de cada curva ROC por meio de uma implementação para o R do algoritmo de DeLong (DELONG; DELONG; CLARKE-PEARSON, 1988). Circunstancialmente, foi utilizado o método de validação interna por reamostragem com *Bootstrap* para correção de sobreajuste. Para tanto, realizamos 1000 reamostragens utilizando a coorte original e calculamos os desfechos clínicos para tempos e covariáveis escolhidos. O procedimento estimou o respectivo intervalo de confiança 95% e o intervalo de aceleração de *bootstrap* e correção de viés.

Os testes para os ensaios funcionais foram analisados utilizando o teste t de Student ou Anova com pós teste de Bonferroni. A expressão gênica

em quantis foi realizada para ranqueamento utilizando o pacote limma-voom no servidor baseado em web Galaxy (<https://usegalaxy.org/>). A expressão gênica diferencial foi avaliada também através dos gráficos de dispersão de tipo vulcão (*Volcano plot*) ou mapa de calor (*Heatmap*). O Volcano plot utilizou dados de expressão em quantis e foi construído com o software GraphPad Prism 8 (Prism, EUA). Os Heatmaps foram construídos com a ferramenta web Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

A sobrevida global foi definida como o tempo decorrido entre o diagnóstico e o óbito e a sobrevida livre de doença como o tempo entre a remissão completa e a recidiva. Os pacientes que não apresentaram os eventos foram censurados na última notificação de que estavam vivos e/ou livres de doença. As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.

Todos os valores de P foram calculados para ambos os lados da distribuição (*Two-Sided*) com nível de significância de 0,05 e computando os respectivos intervalos de confiança. Os testes de inferência estatística foram realizados com auxílio dos programas Stata Statistic/Data analysis versão 12 (Stata Corp, EUA), Statistical Package for Social Sciences 19 (SPSS 19, EUA), GraphPad Prism 8 (Prism, EUA) e R 3.5.2 (Projeto CRAN, www.r-project.org).

4. RESULTADOS

4.1 Investigação da ação de Metformina sob a célula tronco da NMP

A falta de opções terapêuticas curativas para pacientes com NMP é em certa medida relacionada às terapias disponíveis não afetarem a função das células tronco iniciadoras da NMP (CHEN; MULLALLY, 2011; CIBODDO; MULLALLY, 2018; MEAD; MULLALLY, 2017). Nosso grupo de pesquisa determinou previamente o benefício pré-clínico da metformina em monoterapia em modelo murino de NMP induzida pela mutação JAK2V617F (MACHADO-NETO et al., 2018), quanto a redução da esplenomegalia. Para determinar se a metformina poderia interferir na função das células tronco da NMP, realizamos o tratamento *in vivo* com metformina de animais com NMP que recapitula a policitemia vera através de transplante de células totais em receptores letalmente irradiados (Figura 1A).

O tratamento com metformina (125mg/kg/dia) foi bem tolerado, reduziu a esplenomegalia ($P=0,02$, Figura 1B-D) e a contagem de plaquetas ($P<0,05$, Figura 1G) mas não os níveis de hemoglobina e contagem de leucócitos (Figura 1 E-F). O tratamento com metformina diminuiu a frequência de células CD45.2 no sangue periférico ($P<0,05$, Figura 1H). Os animais tratados com metformina tenderam a apresentar menor frequência de progenitores eritroides imaturos no baço (pro-eritroblastos [Pro-E] e progenitores eritroides precoces; ambos $P=0,1$; Figura 2B-C), enquanto apresentaram maior frequência dos progenitores eritroides tardios ($P=0,008$; Figura 2D).

A estratégia para análise imunofenotípicas dos progenitores hematopoiéticos está ilustrada (Figura 3A-C). O tratamento com metformina diminuiu a frequência de células tronco e progenitoras hematopoiéticas (LSK) e progenitores multipotentes ($P<0,05$, Figura 3E), sem afetar a distribuição dos demais progenitores analisados (Figuras 3D-E). Células mononucleares de medula óssea (CMMO) de animais tratados com metformina apresentaram menor capacidade de formação de colônias ($P<0,001$, Figura 3F), com redução de 3,5x do número médio de colônias a cada 1.000 CMMO. A análise molecular de 168 genes em células c-Kit enriquecidas de animais tratados com veículo ou metformina através do método de PCR-Array identificou 77 genes diferencialmente expressos utilizando uma razão de variação de 2 em qualquer

sentido. Entre os genes, 30 tiveram expressão diminuída e 47 genes com expressão aumentada (Figura 3G).

Figura 1. O tratamento com metformina diminui a hematopoese extramedular em camundongos com neoplasia mieloproliferativa $Jak2^{V617F}$

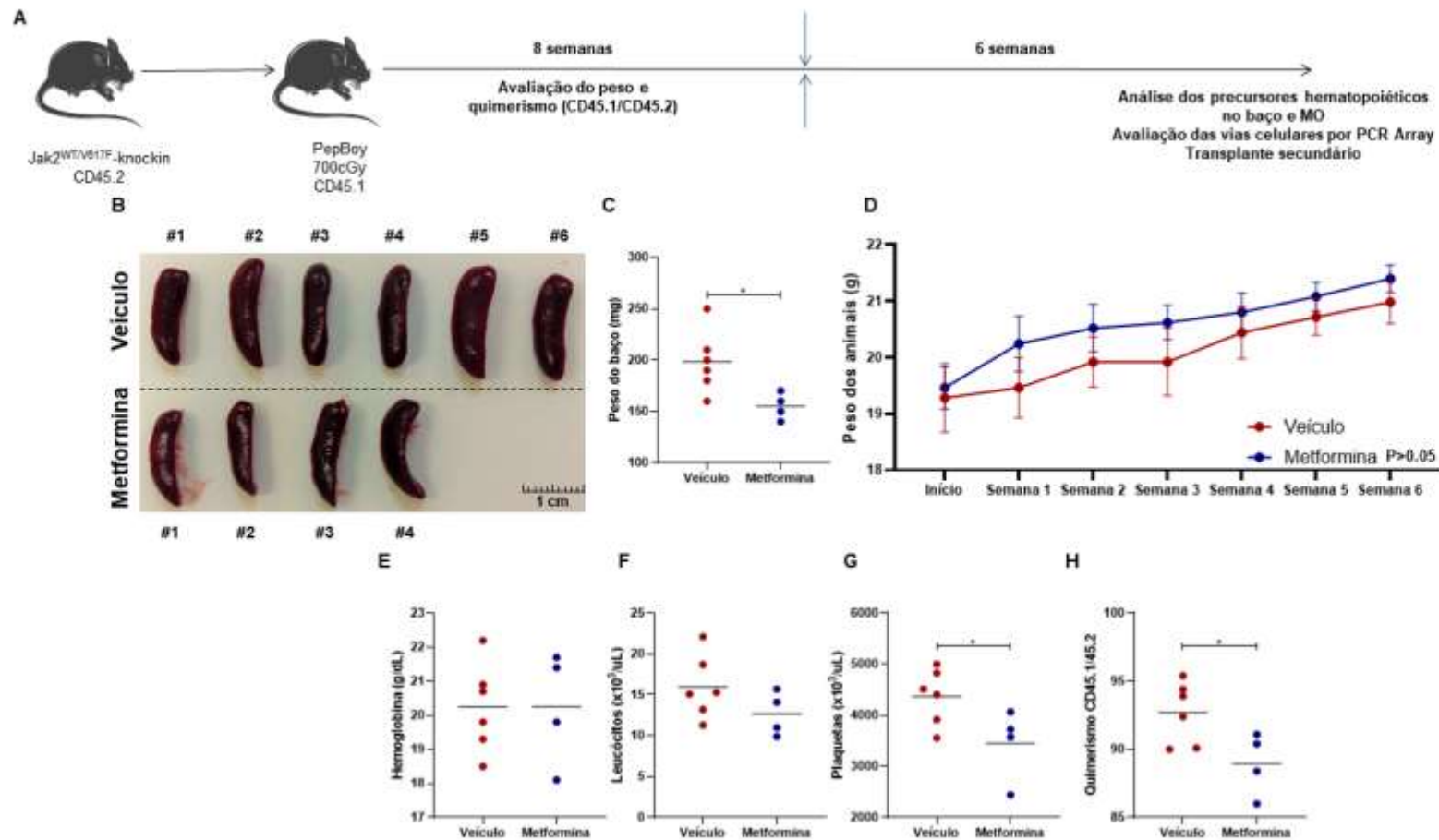


Figura 1 - (A) O desenho experimental para indução de fenótipo de neoplasia mieloproliferativa em camundongos está ilustrado. Células de medula óssea de camundongos *knockin* para mutação $Jak2^{V617F}$ (CD45.2) foram transplantedadas em camundongos *PepBoy* (CD45.1) letalmente irradiados. Após a avaliação do quimerismo na 8ª semana, os camundongos foram randomizados e tratados diariamente com veículo ($n=6$) ou metformina (125mg/kg) ($n=4$) durante 6 semanas. **(B)** Imagens e **(C)** peso dos baços dos camundongos tratados com veículo ou metformina. Barra da escala: 10mm. $* P < 0,05$, teste t de Student. **(D)** Gráfico de pontos indicando a média e os desvio padrão do peso dos animais tratados com veículo ou metformina nas semanas de tratamento. teste t de Student pareado. Gráficos de dispersão representam os níveis de hemoglobina **(E)**, contagens de leucócitos **(F)** e plaquetas **(F)** e o quimerismo CD45.1/CD45.2 **(G)**. $* P < 0,05$, teste t de Student.

Figura 2. O tratamento com metformina altera a distribuição dos progenitores eritroides em modelo murino de NMP.

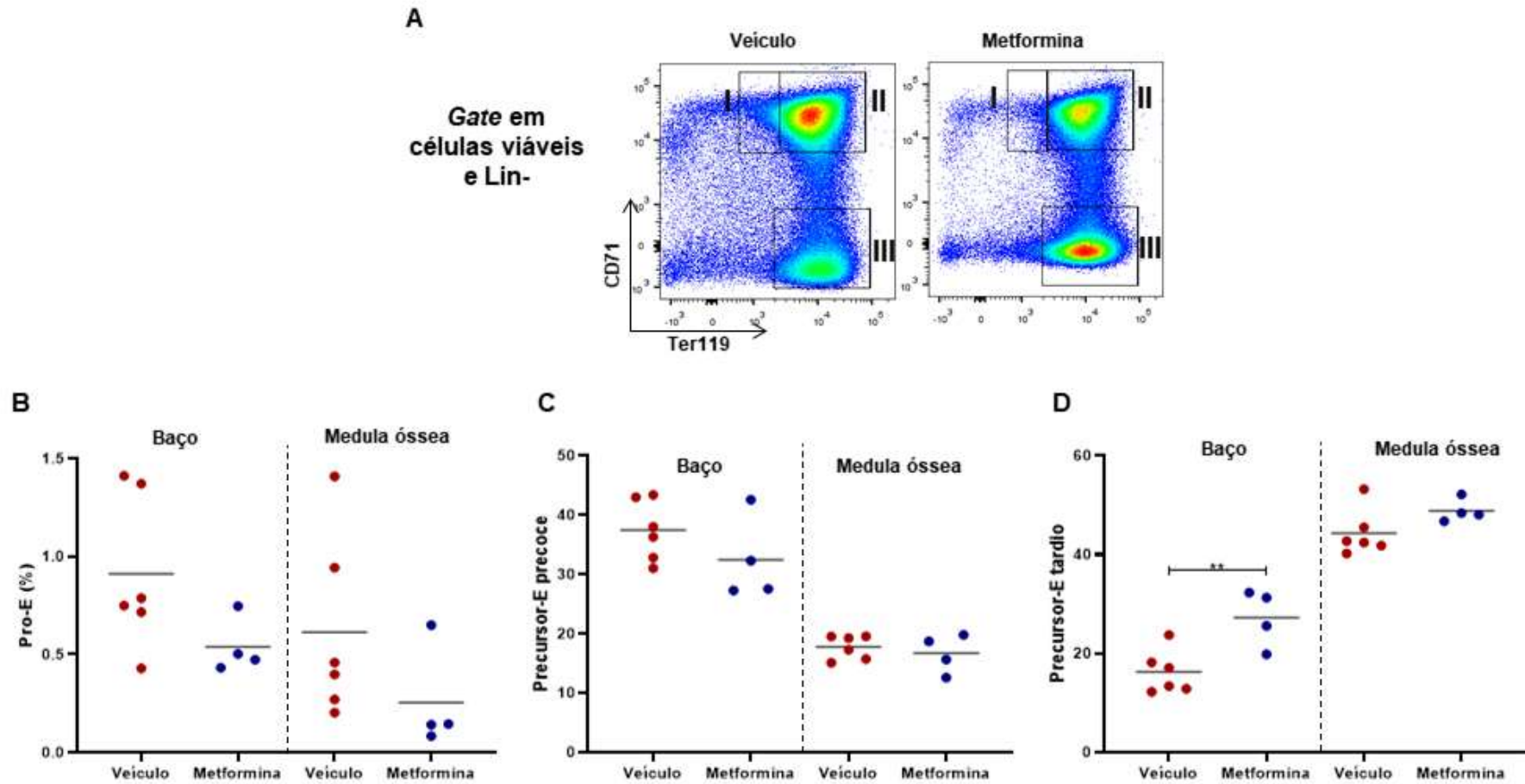


Figura 2 - (A) *Dot plots* representativos da análise de progenitores eritroides no baço. Os gráficos de dispersão representam a frequência de (B) pro-eritroblastos (I-Pro-E), (C) progenitores eritroides precoces (II) e (D) progenitores eritroides tardios (III). ** $P < 0,01$, teste t de Student.

Figura 3. O tratamento com metformina afeta a função da célula tronco da NMP.

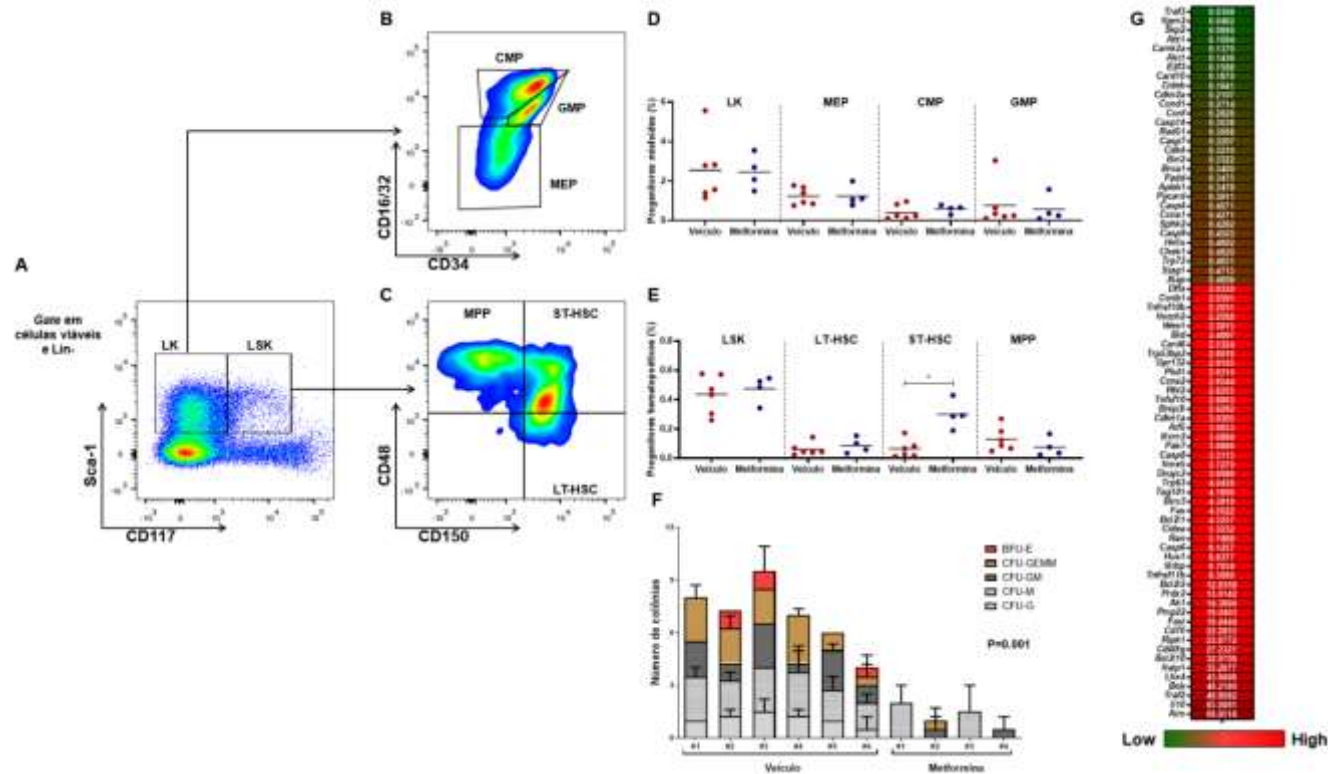


Figura 3 - (A) Dot plots ilustrativos da análise de células tronco e progenitoras hematopoiéticas (LSK) e progenitores mieloides (LK), **(B)** células tronco hematopoiéticas e **(C)** subpopulações de progenitores mieloides. **(D)** Os gráficos de dispersão representam a frequência de progenitores mieloides (LK: Lin⁻c-Kit^{hi}), progenitores mieló-eritroides (MEP), progenitor comum mielóide (CMP) ou progenitor granulocítico-monocítico (GMP). **(E)** Os gráficos de dispersão representam a frequência de células tronco e progenitoras hematopoiéticas (LSK: Lin⁻Sca-1⁺c-Kit^{hi}), células tronco de longo prazo (LT-HSC), células tronco de curto prazo (ST-HSC) ou progenitor multipotente (MPP). **(F)** Gráficos de barra com o número de colônias e os respectivos subtipos computados segundo morfologia, P=0.001, Teste t de Student. **(G)** Dados de expressão gênica mostrados com mapa de calor a partir da análise por qPCR array de células c-Kit enriquecidas de animais tratados com veículo (PBS) ou metformina (125mg/kg/dia). Níveis de expressão gênica foram normalizados pela amostra de animais tratados com PBS e calculados como razão de variação (*fold-change*), sendo selecionados todos com valores superiores a dois em ambas as direções. Em verde estão indicados os genes com expressão diminuída, bem como em vermelho os com expressão aumentada em relação ao grupo veículo. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001

4.2 Proposição de um índice prognóstico baseado em assinatura transcriptômica de células CD34 de pacientes com síndromes mielodisplásicas

Foram selecionados 37 genes que codificam enzimas da glicólise e do ciclo de ácidos tricarboxílicos previamente associados como desregulados em diversas neoplasias sólidas e hematológicas. Dezesete genes foram hiperexpressos e 5 genes hipoexpressos em amostras de pacientes com SMD comparados a indivíduos saudáveis (Figura 4B). A Tabela 2 sumariza os 15 genes cuja expressão gênica foi capaz de prever o desfecho quanto a sobrevida global na análise univariada. Utilizando idade, sexo e categoria de risco segundo o IPSS-R, 5 genes foram independentemente associados a sobrevida global (Figura 4A; Tabela 4) e foram utilizados para a proposição de nosso escore de risco molecular (MBS: Molecular-Based Score).

O cálculo do MBS levou em consideração que a alta expressão de *ANPEP* e *PKM*, assim como a baixa expressão de *ACLY*, *PANK1* e *SLC25A5* foram independentemente associadas a sobrevida global inferior, sendo atribuído peso 1 para cada variável de risco. As associações clínicas e moleculares do MBS estão sumarizadas na tabela 5. O MBS variou entre 0 (pacientes que não apresentaram nenhum dos fatores de risco) e 5 (pacientes que apresentaram todos os fatores de risco) com mediana de 1, e foi calculado da seguinte maneira: MBS risco favorável = 0 (n=28), MBS risco intermediário = 1 (n=46) e MBS risco desfavorável = 2 - 5 (n=53).

Figura 4. Associação de expressão gênica de elementos metabólicos selecionados para o *Molecular-Based Score* (MBS).

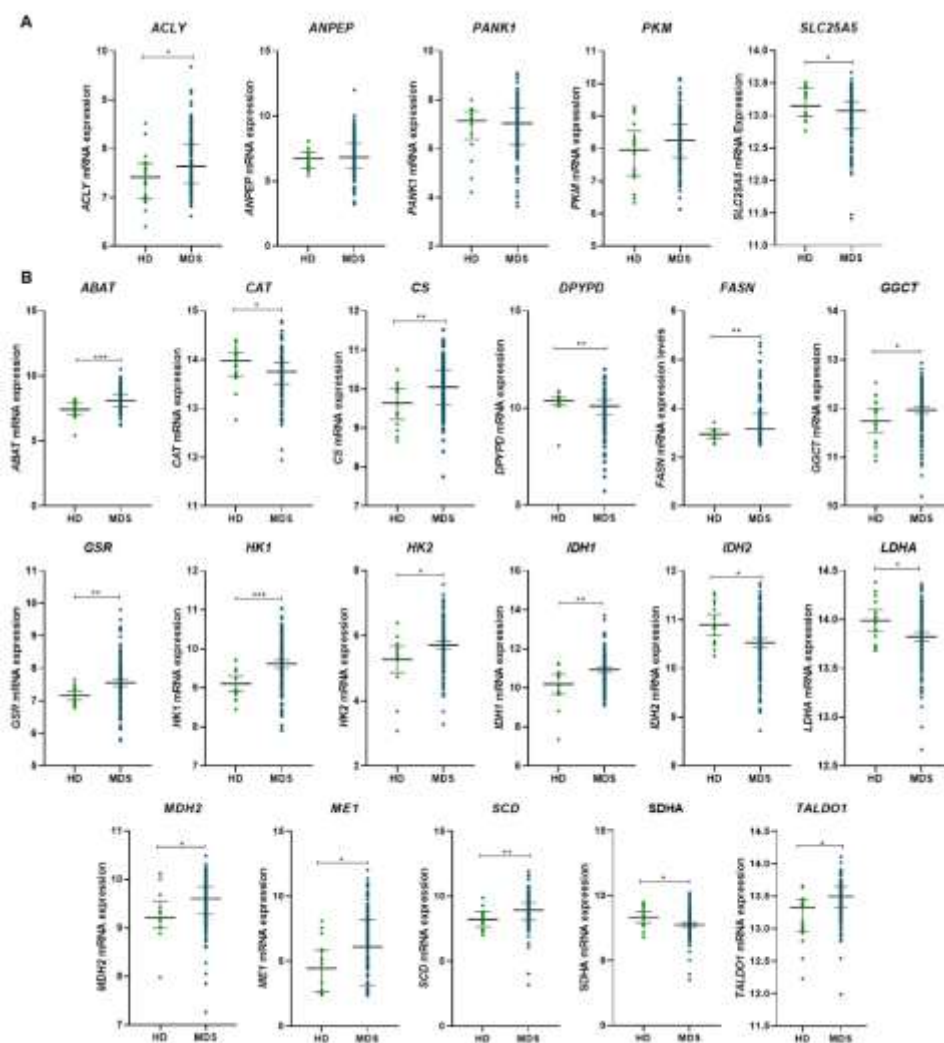


Figura 4 - Gráficos de dispersão de acordo com a expressão de genes selecionados e estudados para a composição do MBS. A comparação da expressão de cada gene entre indivíduos saudáveis (HD) e pacientes com síndromes mielodisplásicas (SMD) é apresentada. Os genes indicados no painel superior (**A**) indicam os genes que compõem o MBS.

Nota: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, Teste de Mann-Whitney.

Tabela 4. Lista de genes associados a sobrevida global em análise univariada

Alvo	Análise Univariada			Análise Multivariada		
	Hazard Ratio ¹	IC95%	P	Hazard Ratio ¹	IC95%	P
<i>GAD1</i>	0,34	0,17-0,66	0,001	0,73	0,3-1,73	0,47
<i>ANPEP</i>	2,73	1,44-5,17	0,002	2,16	1,08-4,31	0,02
<i>ACLY</i>	0,38	0,21-0,72	0,002	0,48	0,24-0,96	0,02
<i>DPYPD</i>	3,19	1,33-7,65	0,008	2,22	0,9-5,48	0,08
<i>MDH2</i>	0,43	0,23-0,81	0,009	0,6	0,31-1,21	0,15
<i>SLC25A5</i>	0,44	0,24-0,83	0,01	0,52	0,27-0,99	0,04
<i>GOT2</i>	0,37	0,17-0,80	0,01	0,58	0,24-1,36	0,21
<i>PKM</i>	2,24	1,18-4,23	0,01	2,01	1,02-3,93	0,04
<i>SLC2A5</i>	2,17	1,16-4,05	0,01	1,84	0,88-3,87	0,1
<i>GSS</i>	0,46	0,24-0,86	0,01	0,65	0,32-1,31	0,22
<i>LDHB</i>	0,42	0,21-0,85	0,01	0,61	0,28-1,28	0,19
<i>PANK1</i>	0,42	0,21-0,86	0,01	0,43	0,19-0,98	0,04
<i>IDH3G</i>	0,25	0,07-0,84	0,02	0,34	0,11-1,16	0,08
<i>SCD</i>	2,31	1,1-4,87	0,02	1,56	0,72-3,38	0,25
<i>SDHA</i>	0,42	0,18-0,98	0,04	0,51	0,21-1,17	0,11

Abreviação: IC95%: Intervalo de confiança de 95%. Os genes independentemente associados a sobrevida global estão destacados.

Hazard ratio < 1 indica que o primeiro valor da variável categórica possui pior desfecho.

Utilizando o modelo de risco proporcionais de Cox para a análise multivariada, o MBS foi independentemente associado a sobrevida global utilizando sexo, idade e IPSS-R como confundidores (Tabela 6). O MBS apresentou alto poder preditivo (Figura 5) possuindo estatística C de área sob a curva = 0,71 (IC95%: 0.62 – 0.78) e Hazard ratio de 3,05 (IC95%: 1.81 – 5.05; P<0.001) (Tabela 7). Nós validamos nosso escore de risco através do método não paramétrico de reamostragem de Bootstrap, demonstrando a estabilidade de seu poder preditivo (Tabela 8).

Tabela 5: Características clínicas dos pacientes com SMD incluídos para o cálculo do índice baseado em expressão gênica (MBS).

Características	Todos os pacientes			Molecular-Based Score									P
	No.	%	Mediana (variação)	Risco favorável			Risco intermediário			Risco adverso			
				No.	%	Mediana (variação)	No.	%	Mediana (variação)	No.	%	Mediana (variação)	
N	159	100		28	17.6		60	37.8		71	44,6		
Sexo													0.08
Feminino	57	35.8		15	46.4		21	35		21	30		
Masculino	102	64.2		13	53.6		39	65		50	70		
Idade, anos			67 (19 - 87)			63 (32 - 82)			67 (19 - 87)			67 (33 - 87)	0.439
Blastos na medula óssea, %			4 (0 - 63)			2.5 (0 - 14)			3 (0 - 63)			8.5 (0 - 46)	<0.001
Hemoglobina, g/dL			9.5 (4.5 - 14.6)			10 (6.9 - 11.9)			9.45 (5.4 - 14.6)			9.8 (4.5 - 14.4)	0.952
Contagem absoluta de neutrófilos, $\times 10^3/\mu\text{L}$			1.8 (0.08 - 15.2)			2.5 (0.91 - 5.36)			2.3 (0.38 - 6.4)			1.3 (0.08 - 15.2)	0.003
Plaquetas, $\times 10^3/\mu\text{L}$			152 (10 - 1042)			250 (38 - 787)			157 (16 - 604)			109 (10 - 1042)	0.007
Dependência transfusional													0.627
Sim	58	44.3		9	57.1		27	55.1		30	52.7		
Não	73	55.7		16	32.1		22	44.9		27	47.3		
IPSS-R													<0.001
Muito baixo	27	17.0		8	28.6		14	23.3		5	7.1		
Baixo	53	33.3		12	42.9		26	43.3		15	21.4		
Intermediário	44	27.7		5	17.9		15	25		24	33.8		
Alto	23	14.5		3	10.7		1	1.7		19	26.8		
Muito alto	12	7.5		0	0		4	6.7		8	11.3		
WHO 2008 category													<0.001
RA	13	8.2		1	3.6		9	15		3	4.2		
RCMD	27	17.0		1	3.6		16	26.7		10	14.1		
RCMD-RS	22	13.8		7	25		10	16.7		5	7		
RARS	14	8.8		8	28.6		4	6.7		2	2.9		
RARS-T	6	3.8		4	14.3		2	3.3		0	0		
MDS with 5q-	6	3.8		2	7.1		4	6.7		0	0		
RAEB	28	17.6		1	3.6		9	15		18	25.3		
RAEB-2	28	17.6		4	14.3		3	5		21	29.6		

AML-MDS	7	4.4	0	0	1	1.7	6	8.4	
NI	8	5.0	0	0	2	3.3	6	8.4	
Mutações									
<i>SF3B1</i>	37	29.8	14	50	15	31.9	8	14.8	<0.001
<i>TET2</i>	33	20.8	5	21.7	14	29.8	14	25.6	0.765
<i>ASXL1</i>	21	13.2	2	8.7	6	12.8	13	24.1	0.161
<i>SRSF2</i>	16	10.1	1	4.3	6	12.7	9	16.7	0.336
<i>DNMT3A</i>	13	8.2	3	13	7	14.9	3	5.5	0.282
<i>RUNX1</i>	8	6.5	0	0	1	2.1	7	12.9	0.03
<i>U2AF1</i>	8	6.5	1	4.3	1	2.1	6	11.2	0.168

Notas: IPSS-R: Sistema Internacional de pontuação prognóstica Revisado; RA: Anemia refratária; RCMD: Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens; RCMD-RS: refrac Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens com sideroblasto em anel; RARS: anemia refratária com sideroblasto em anel; RARS-T: anemia refratária com sideroblasto em anel e trombocitose; RAEB: Anemia refratária com excesso de blastos. AML-MDS: LMA com alterações mielodisplásicas; NI: Não informado.

Figura 5. Análise de sobrevida para pacientes com síndromes mielodisplásicas de acordo com *Molecular-Based Score* (MBS)

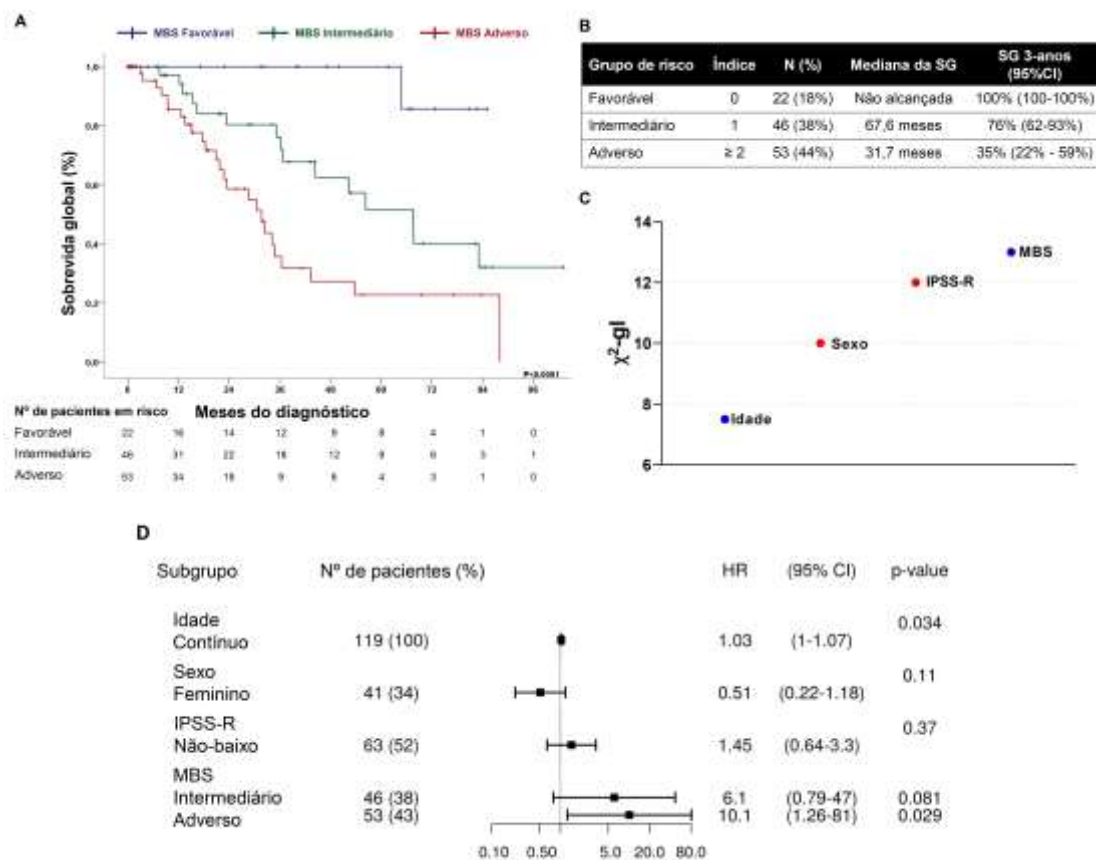


Figura 5 - (A-B) Análise de sobrevida global (SG) para pacientes com SMD provenientes da coorte GSE58831 disponibilizados na plataforma Gene Expression Omnibus (GEO-NCBI). Pacientes com baixo MBS (n=22) apresentam desfecho clínico favorável quanto a sobrevida global. A curva de sobrevida foi construída pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank. (C) Significância (estatística- χ^2) de cada covariável incluída no modelo multivariado para predição de SG. (D) Forest-plot com dados do teste de validação cruzada por reamostragem (Bootstrap) identificou MBS de risco adverso e idade como preditores independentes de SG. HR e os respectivos 95%CI estão indicados por um quadrado e uma linha, respectivamente.

Nota: MBS: Molecular-Based Score; gl: graus de liberdade; 95%CI: Intervalo de confiança de 95%; HR: Hazard ratio.

Tabela 6. Análises univariada e multivariada para sobrevida global de pacientes com SMD

Variáveis	Sobrevida global					
	Análise Univariada			Análise Multivariada		
	HR ¹	(95% C.I.)	p	HR	(95% C.I.)	p
Sexo M vs. F	0,31	0,14 – 0,63	0,001	0,47	0,21 - 1,06	0,072
Idade	1,04	1,01 – 1,07	0,006	1,03	1,01 – 1,07	0,02
IPSS-R	1,52	1,18 – 1,96	0,001	2,51	0,69 – 1,37	0,882
MBS	3,05	1,84 – 5,05	>0,001	2,51	1,27 – 4,96	0,008

Abreviações: SMD: Síndromes mielodisplásicas; IPSS-R: *International Prognostic Score System-revised*

Hazard ratio < 1 indica que o primeiro valor da variável categórica possui pior desfecho.

Tabela 7: Sobrevida global (SG) e poder preditivo de IPSS-R e MBS.

Variáveis	SG de 2 anos (95%IC)	SG de 3 anos (95%IC)	P-Valor ¹	AUC (95%IC)
IPSS-R			0,004	0,57 (0,46 – 0,67)
Muito baixo	78% (59-100%)	78% (59-100%)		
Baixo	85% (73-98%)	74% (60-92%)		
Intermediário	69% (50-93%)	43% (23-80%)		
Alto	69% (44-100%)	55% (30-100%)		
Muito alto	43% (18-100%)	43% (18-100%)		
MBS			<0,001	0,71 (0,62 – 0,78)
Favorável	100% (100-100%)	100% (100-100%)		
Intermediário	80% (67-96%)	76% (62-93%)		
Adverso	59% (44-77%)	35% (22-59%)		

Notas: IPSS-R: Sistema Internacional de pontuação prognóstica Revisado; MBS: Molecular-Based Score. 95%IC: Intervalo de confiança de 95%. ¹teste de Log-Rank

Tabela 8: Validação interna por reamostragem pelo método de *Bootstrap* para sobrevida global (SG)

MBS	SG de 2 anos (95%IC)	P-Valor	SG de 3 anos (95%IC)	P-Valor
Favorável	100% (100-100%)	<0,001	100% (100-100%)	<0,001
Intermediário	81% (62 - 93%)		76% (57 - 90%)	
Adverso	58% (42 – 75%)		35% (19 – 56%)	

Notas: MBS: *Molecular-Based Score*;

A predição prognóstica do MBS foi consistente quando avaliada para os pacientes identificados como de risco muito baixo e baixo segundo o IPSS-R (Figura 6A). As entidades de risco do MBS foram identificadas em todas as categorias do IPSS-R, entretanto, o aumento do risco do IPSS-R está associado com o aumento do risco MBS (Figura 6B e Tabela 5).

A análise de enriquecimento de conjuntos gênicos (GSEA) revelou que o aumento do risco do MBS (i.e. favorável *versus* (vs.) intermediário; favorável vs. adverso; e intermediário vs. adverso) foi consistentemente associado com o aumento dos programas relacionados a fosforilação oxidativa e circuitos de controle da progressão do ciclo celular, tais como *G2M_checkpoint* e *E2F_targets*, e metabolismo de ácidos graxos (Figura 7A-C). Para comparações específicas, pacientes de risco favorável pelo MBS foram positivamente enriquecidos com programas de diferenciação de progenitor megacariocítico-eritroide (MEP) e negativamente enriquecido com assinatura (EPPERT et al., 2011) de célula tronco leucêmico (Figura 7D). Em concordância, pacientes de risco favorável apresentaram enriquecimento positivo com metabolismo mitocondrial (MOOTHA et al., 2003) e negativo com célula tronco hematopoiética (Figura 7E) (JAATINEN et al., 2006). Pacientes de risco adverso apresentaram enriquecimento negativo com o programa transcricional de MEP com genes com

expressão diminuída em célula tronco leucêmica (Figura 7F). Utilizando critérios estatísticos rigorosos (aumento: \log_2 da razão de variação $>1,5$; diminuição $<1,5$; $P < 0,05$), identificou-se genes diferencialmente expressos: favorável vs. intermediário (8 genes com expressão aumentada e 16 com expressão diminuída), favorável vs. adverso (10 genes com expressão aumentada e 129 com expressão diminuída) e intermediário vs. adverso (5 genes com expressão aumentada e 42 com expressão diminuída) (Figura 7G-I). O agrupamento hierárquico não supervisionado demonstrou que a classificação do MBS identifica pacientes com programas transcricionais particulares (Figura 7J), especialmente relacionadas com o controle da energética celular e diferenciação dos progenitores hematopoiéticos.

Figura 6. Análise de sobrevida para pacientes com síndromes mielodisplásicas de risco muito baixo e baixo e distribuição do risco MBS e IPSS-R

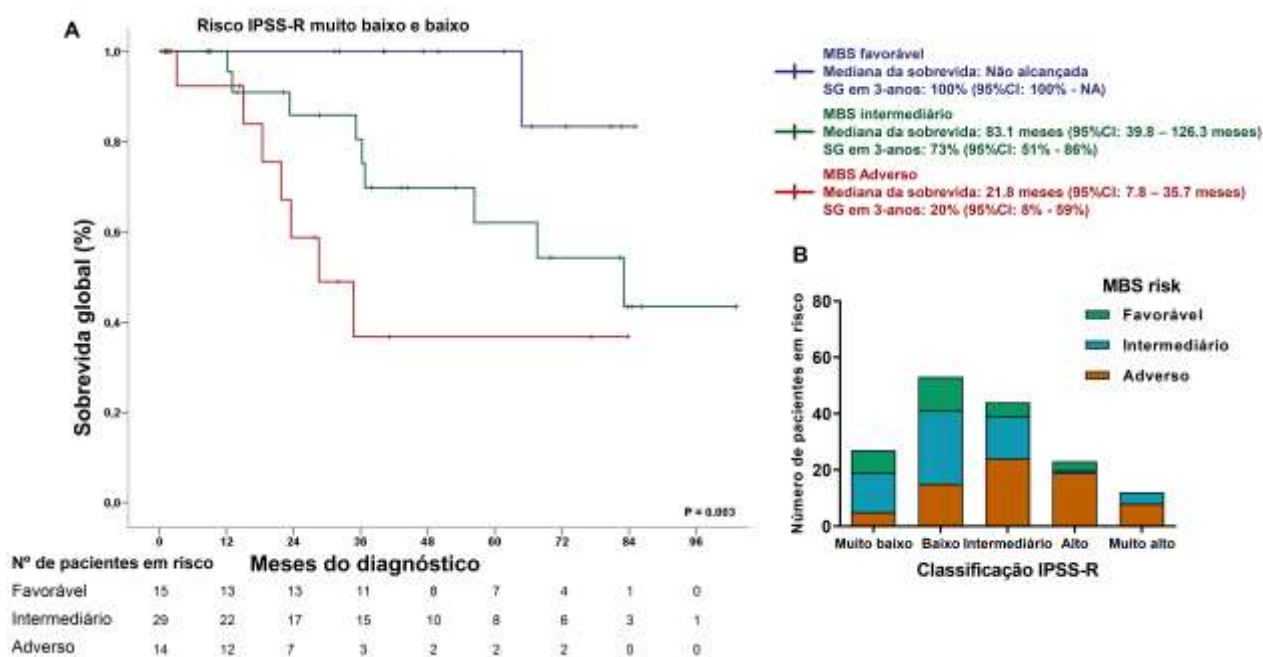


Figura 6 - (A) Análise de sobrevida global (SG) para pacientes com SMD de risco baixo e muito baixo segundo classificação do IPSS-R provenientes da coorte GSE58831. Pacientes com baixo MBS ($n=15$) apresentam desfecho clínico favorável quanto a sobrevida global. A curva de sobrevida foi construída pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank. **(B)** Gráfico barra indicando a sobreposição entre as classificações do IPSS-R e do proposto MBS.

Nota: MBS: *Molecular-Based Score*; 95%CI: Intervalo de confiança de 95%.

Figura 7. As entidades do MBS são associadas com diferentes programas transcriptômicos.

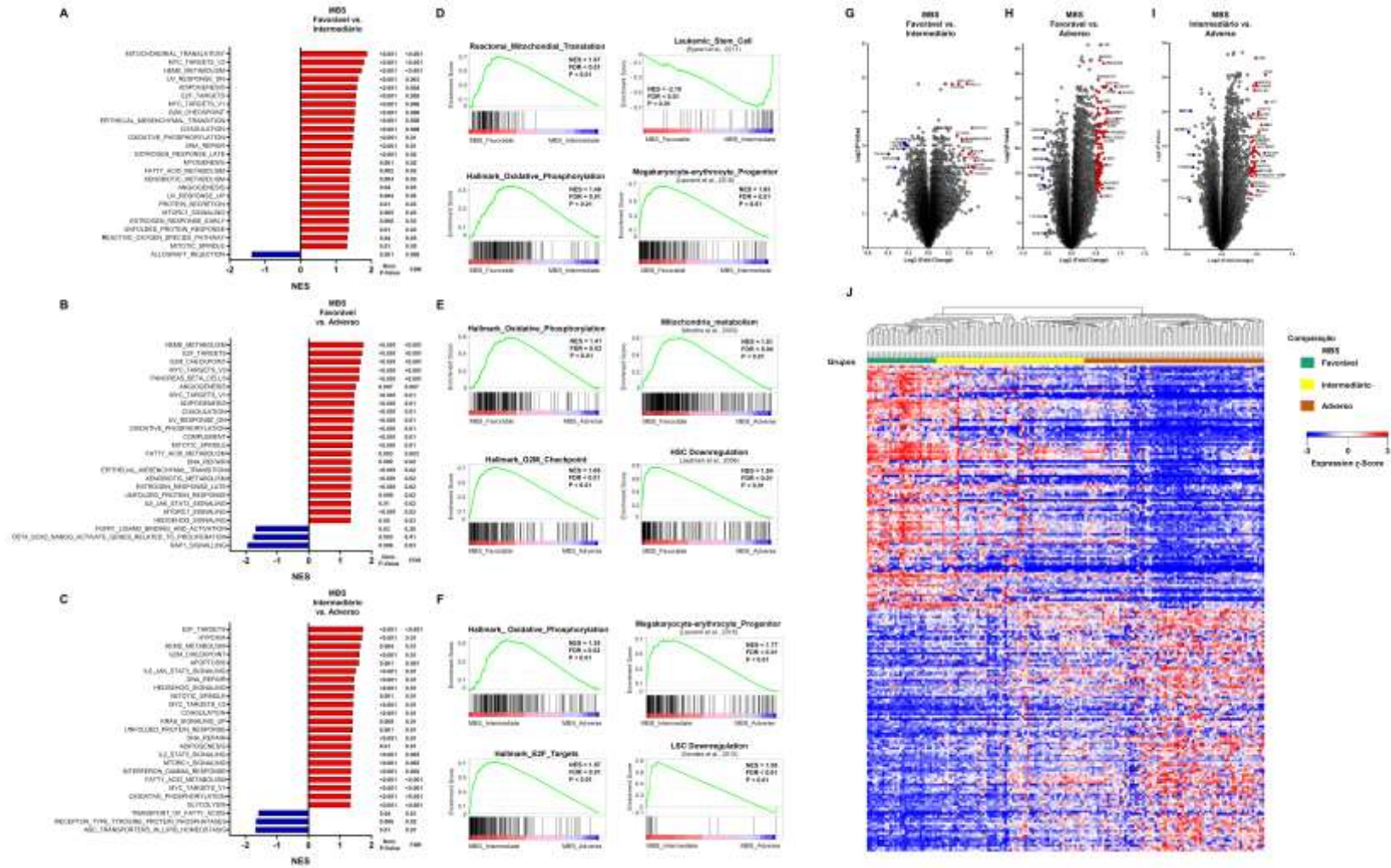


Figura 7 - (A-C) Análise de enriquecimento de conjuntos gênicos (GSEA) de módulos compilados do Hallmarks do banco de dados de assinaturas moleculares. Comparações específicas são indicadas na figura. Foram identificados como associados conjuntos gênicos com razão de falsa descoberta <0,25, índice de enriquecimento normalizado > |1,5| e valor de P < 0,05. (D-F) Gráficos de enriquecimento representativos para análise de GSEA. Comparações específicas estão indicadas. (G-I) Gráficos de vulcão (*volcano plot*) demonstrando a extensão (eixo X) e a significância (eixo Y) dos genes diferencialmente expressos para cada comparação específica. (J) Mapa de calor resumindo os

200 genes mais diferencialmente expressos entre as entidades do MBS. A intensidade das cores representa o índice Z em cada linha. Os valores de expressão para genes com múltiplas sondas são representados pela respectiva mediana e o agrupamento utilizou um algoritmo baseado em média K. O mapa de calor foi construído utilizando o Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

4.3 Expressão diferencial de *IGF1R* e *IGF2R* segundo grupos de risco dos pacientes com LMA

Após estratificação de acordo com o risco de recaída para os pacientes com LPA e risco integrado para os pacientes com LMA do estudo TCGA, observou-se que pacientes com LPA de risco intermediário apresentam menor expressão de *IGF1R*, assim como os pacientes de baixo risco apresentam menores níveis de expressão de *IGF2R* (Figura 8A). Contrariamente, os diferentes riscos citogenéticos em pacientes com LMA do estudo TCGA não apresentam diferença segundo a expressão de *IGF1R* e *IGF2R* (Figura 8B).

Figura 8: Associação de expressão de *IGF1R* e *IGF2R* de acordo com a estratificação de risco para pacientes com LMA

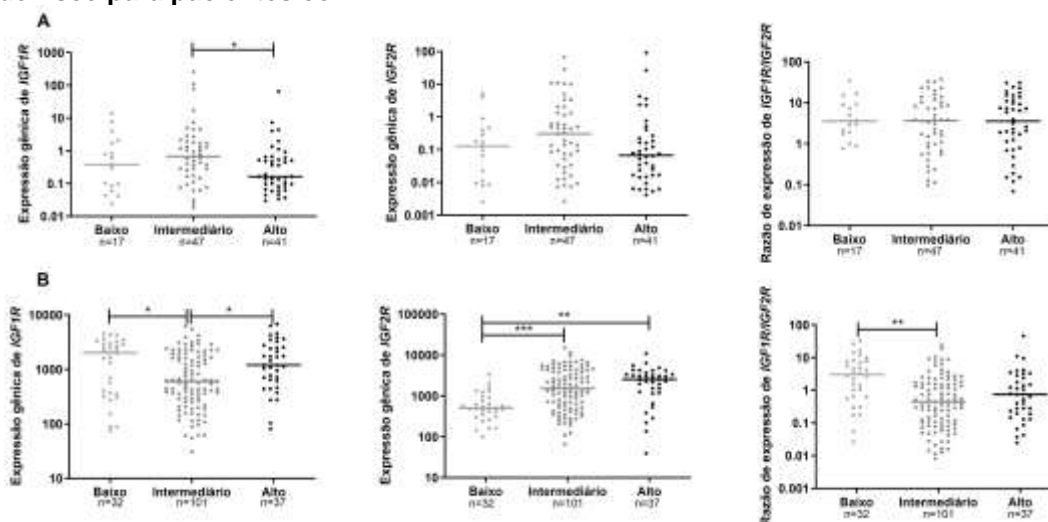


Figura 8 - (A) Gráfico de dispersão para expressão de *IGF1R*, *IGF2R* e razão de *IGF1R/IGF2R* de acordo com o risco de recaída para pacientes com LPA **(B)** ou com o risco citogenético para os pacientes com LMA. Os subtipos de LMA e valores de P estão indicados; teste de Mann-Whitney.

Nota: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.4 Expressão de *IGF1R* e *IGF2R* prediz prognóstico em LMA:

A análise de sobrevida dos pacientes da coorte de LMA do TCGA evidenciou que pacientes com alta expressão de *IGF1R* ($P=0.033$), bem como aqueles com baixa expressão de *IGF2R* ($P=0.009$) possuem piores índices de sobrevida global quando comparados aos pacientes alocados nos outros grupos. Analogamente, pacientes com alta razão *IGF1R/IGF2R* apresentaram piores índices para sobrevida global ($P < 0.001$) e sobrevida livre de doença ($P=0.01$) (Figura 9). A alta razão de expressão *IGF1R/IGF2R* foi independentemente associada a pior sobrevida global em pacientes com LMA utilizando idade,

contagem de leucócitos ao diagnóstico e risco integrado como confundidores (Tabela 9).

Figura 9: Desfechos clínicos para pacientes com leucemia mieloide aguda de acordo com a expressão de *IGF1R* e *IGF2R*

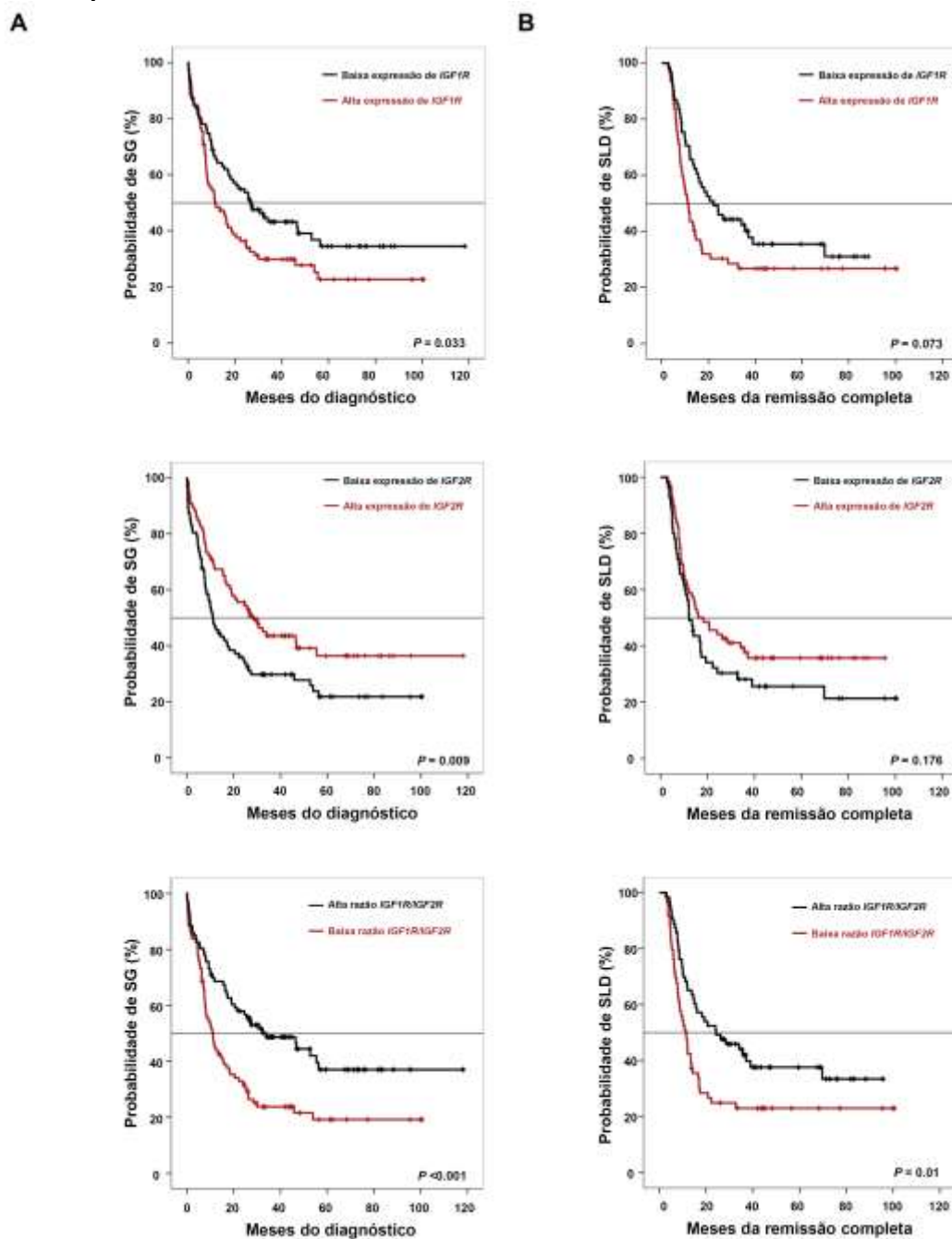


Figura 9 - (A) Análise de sobrevida global e **(B)** sobrevida livre de doença para pacientes com LMA provenientes do estudo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e disponibilizados *online* no *Cbio portal for cancer genomics*. Pacientes com alta expressão de *IGF1R*, bem como baixa expressão de *IGF2R* possuem prognóstico desfavorável quanto a sobrevida global, mas não para sobrevida livre de doença. A razão de expressão *IGF1R* e *IGF2R* foi calculada através da divisão do número de leituras provenientes do RNA-Seq utilizado para o trabalho original. Pacientes com maiores razões de expressão *IGF1R/IGF2R* possuem piores índices de sobrevida global e livre de doença (todos $P < 0.05$). As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.

Tabela 9: Análise univariada e multivariada para os pacientes com LMA provenientes do estudo do TCGA.

Fatores	Análise univariada					
	Sobrevida livre de doença			Sobrevida global		
	<i>Hazard Ratio</i> ¹	(I.C. 95%)	<i>p</i>	<i>Hazard Ratio</i> ¹	(I.C. 95%)	<i>p</i>
Idade	1.01	0.99 – 1.02	0.078	1.03	1.02 – 1.05	>0.001
Estratificação de risco citogenética Alto vs. Intermediário vs. Baixo	1.69	1.22 – 2.32	>0.001	1.99	1.51 – 2.65	>0.001
Leucócitos (X10⁹/L)	1.01	1.001 – 1.02	0.009	1.01	1.001 – 1.1	0.021
Expressão de <i>IGF1R</i>	1.42	0.91 – 2.19	0.115	1.44	1.01 – 2.09	0.042
Expressão de <i>IGF2R</i>	0.74	0.48 – 1.14	0.179	0.63	0.43 – 0.92	0.017
Razão de expressão <i>IGF1R/IGF2R</i>	1.71	1.11 – 2,63	0.017	1.87	1.28 – 2.72	>0.001
Fatores	Análise multivariada					
	Sobrevida livre de doença			Sobrevida global		
	<i>Hazard Ratio</i> ¹	(I.C. 95%)	<i>p</i>	<i>Hazard Ratio</i> ¹	(I.C. 95%)	<i>p</i>
Idade	1.01	0.99 – 1.02	0.097	1.04	1.02 – 1.05	>0.001
Estratificação de risco citogenética Alto vs. Intermediário vs. Baixo	1.66	1.18 – 2.33	0.003	1.98	1.44 – 2.69	>0.001
Leucócitos (X10⁹/L)	1.006	1.001 – 1.01	0.012	1.01	1.002 – 1.02	0.003
Razão de expressão <i>IGF1R/IGF2R</i>	1.36	0.87 – 2.12	0.169	1.49	1.02 – 2.17	0.039

Abreviações: LMA: Leucemia Mieloide Aguda; TCGA: The Cancer Genome Atlas

¹*Hazard ratio* > 1 indicam que o primeiro fator possui pior prognóstico.

Para pacientes com LPA da coorte de nossa Instituição, a alta expressão de *IGF1R* prediz pior sobrevida livre de doença ($P=0.035$), enquanto a baixa expressão de *IGF2R* identifica os pacientes com pior sobrevida global ($P=0.027$). Pacientes com LPA com alta razão *IGF1R/IGF2R* possuem piores índices de sobrevida livre de doença ($p=0.04$), mas não para sobrevida global ($P>0.05$) (Figura 10). A alta razão de expressão *IGF1R/IGF2R* foi independentemente associada a pior sobrevida livre de doença em pacientes com LPA utilizando idade, contagem de leucócitos ao diagnóstico e a estratificação de risco como confundidores (Tabela 10).

Figura 10: Desfechos clínicos para pacientes com leucemia promielocítica aguda de acordo com a expressão de *IGF1R* e *IGF2R*

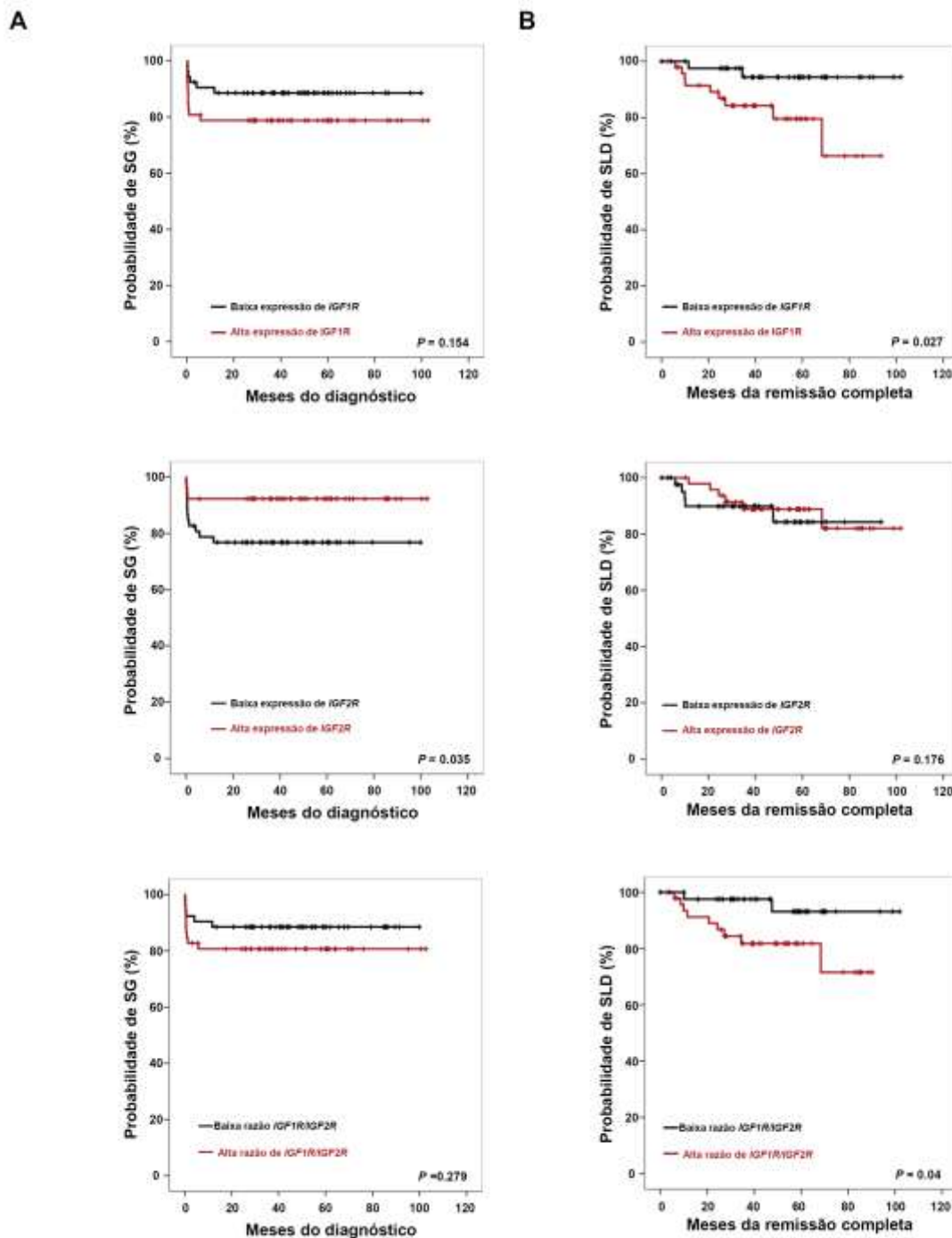


Figura 10 - (A) Análise de sobrevida global e (B) sobrevida livre de doença para pacientes com LPA provenientes do protocolo internacional para Leucemia Promielocítica Aguda (IC-APL). Pacientes baixa expressão de *IGF2R* possuem prognóstico desfavorável quanto a sobrevida global, mas não para sobrevida livre de doença. A razão de expressão *IGF1R* e *IGF2R* foi calculada através da divisão do valor de quantificação relativa. Pacientes com maiores razões de expressão *IGF1R/IGF2R* possuem piores índices de sobrevida livre de doença. As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.

Tabela 10: Análise univariada e multivariada para os pacientes com LPA

Fatores	Análise univariada					
	Sobrevida livre de doença			Sobrevida global		
	<i>Hazard Ratio</i> ¹	(I.C. 95%)	<i>p</i>	<i>Hazard Ratio</i> ¹	(I.C. 95%)	<i>p</i>
Idade	0.94	0.88 – 1.01	0.094	1.01	0.97 – 1.04	0.535
Estratificação de risco Alto vs. Intermediário vs. Baixo	3.43	1.02 – 12.63	0.044	1.54	0.75 – 3.21	0.241
Leucócitos (X10 ⁹ /L)	1.01	1.001 – 1.02	0.036	1.01	1.001 – 1.1	>0.001
Expressão de <i>IGF1R</i>	3.99	0.89 – 19.06	0.093	1.92	0.72 – 5.21	0.196
Expressão de <i>IGF2R</i>	0.59	0.14 – 2.39	0.465	0.31	0.11 – 0.96	0.044
Razão de expressão <i>IGF1R/IGF2R</i>	5.92	0.77 - 10.89	0.094	1.72	0.63 – 4.76	0.291
Fatores	Análise multivariada					
	Sobrevida livre de doença			Sobrevida global		
	<i>Hazard Ratio</i> ¹	(I.C. 95%)	<i>p</i>	<i>Hazard Ratio</i> ¹	(I.C. 95%)	<i>p</i>
Idade	0.94	0.86 – 1.01	0.136	1.01	0.98 – 1.05	0.362
Estratificação de risco Alto vs. Intermediário vs. Baixo	1.96	0.45 – 8.47	0.364	0.77	0.28 – 1.76	0.453
Leucócitos (X10 ⁹ /L)	1.001	0.99 – 1.01	0.158	1.001	1.0001 – 1.01	0.008
Razão de expressão <i>IGF1R/IGF2R</i>	13.9	1.05 - 21.13	0.047	1.16	0.38 – 3.52	0.28

Abreviação: LPA: Leucemia Promielocítica Aguda.

¹*Hazard ratio* > 1 indicam que o primeiro fator possui pior prognóstico.

4.5A inibição farmacológica de IGF1R possui efeitos antineoplásicos em células de pacientes com LMA

Amostras de cinco pacientes com LMA foram utilizadas para verificação da atividade antineoplásica *ex vivo* do inibidor farmacológico de IGF1R/IR. Linsitinibe diminuiu a viabilidade e induziu apoptose em uma maneira dose dependente (Figura 11).

Figura 11. Linsitinibe possui efeitos antineoplásicos em células primárias de pacientes com LMA.

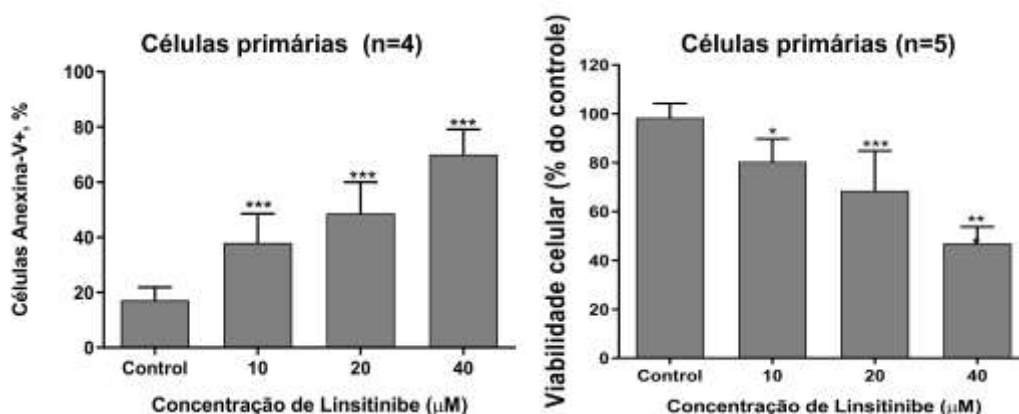


Figura 11 - (A) A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células primárias de pacientes com LMA tratadas ou não com Linsitinibe por 72 horas usando o método de coloração Anexina V/PI. Os gráficos de barra representam a média com desvio padrão dos resultados de quatro pacientes. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT em células de pacientes com LMA tratadas ou não com Linsitinibe por 72 horas e normalizada por células não tratadas correspondentes. Os gráficos de barras representam a média com desvio padrão de cinco pacientes. Os valores de *P* e doses de Linsitinibe. Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni

Nota: **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001.

4.6 Investigação das propriedades antineoplásicas *in vitro* da inibição farmacológica de IGF1R em LMA

Foi utilizado um painel de 9 linhagens de células de neoplasias mieloides para identificar aquelas mais sensíveis ao tratamento com Linsitinibe. Os ensaios posteriores foram realizados com as linhagens celulares NB4, NB4-R2 e Kasumi-1.

4.6.1 Linsitinibe reduz a viabilidade de linhagens celulares de LMA

A figura 12 representa um painel de linhagens utilizado para seleção de linhagens que respondiam ao Linsitinibe, as células NB4, NB4-R2 e Kasumi-1 foram as que apresentaram menores concentrações inibitórias de 50% (IC50).

Figura 12: A inibição farmacológica de IGF1R diminui a viabilidade celular de linhagens celulares de LMA

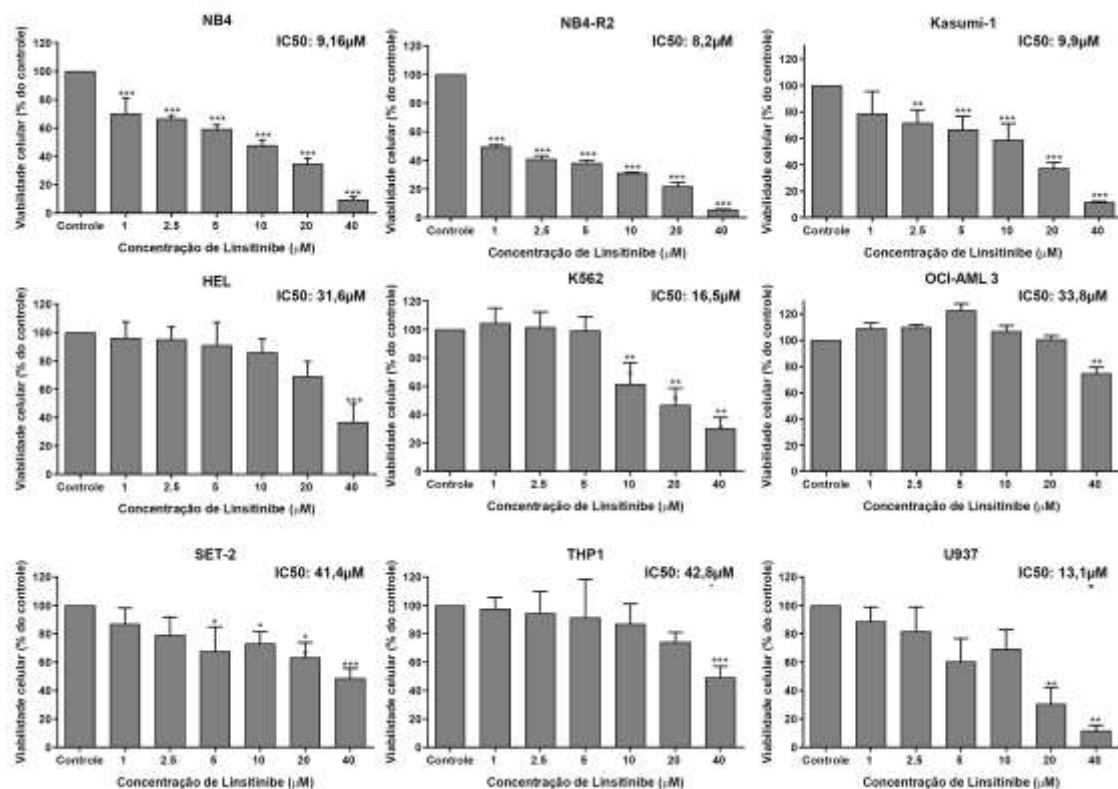


Figura 12 - A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT em um painel com nove linhagens celulares tratadas ou não com linsitinibe por 72 horas e normalizada por células não tratadas correspondentes. Os gráficos de barras representam a média com desvio padrão de, pelo menos, quatro experimentos independentes. Os valores de *P*, as linhagens celulares com as respectivas concentrações inibitórias 50% (IC50) e doses estão indicadas nos gráficos. Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni e regressão não linear.

Nota: **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001.

4.6.2 Linsitinibe induz apoptose em linhagens celulares de LMA

Estimulados pelos resultados anteriores da redução da viabilidade, motivamo-nos a investigar se o Linsitinibe induziria apoptose nas linhagens NB4, NB4-R2 e Kasumi-1. A inibição farmacológica de IGF1R induziu apoptose nas três linhagens em maneira dose dependente (Figura 13) após 72 horas de exposição.

Figura 13: Linsitinibe induz apoptose em linhagens celulares de LMA

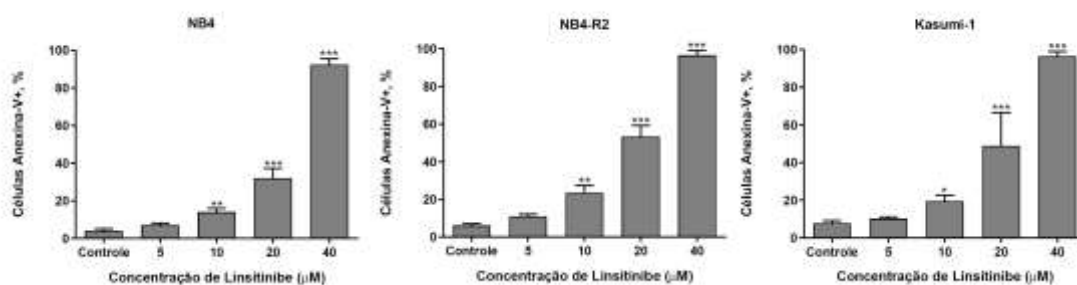


Figura 13 - A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células NB4, NB4-R2 e Kasumi-1 tratadas ou não com linsitinibe por 72 horas usando o método de coloração Anexina V/PI. Os gráficos de barra representam a média com desvio padrão de ao menos quatro experimentos independentes. Os valores de p , linhagens celulares e dose de linsitinibe utilizadas estão indicadas.

Nota: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.6.3 Linsitinibe induz autofagia em linhagens celulares de LMA

Através da observação de que a IC50 calculada induziu apoptose em níveis inferiores aos esperados, postulamos que o mecanismo de autofagia estaria sendo ativado como mecanismo de limitação da eficiência terapêutica. Utilizando citometria de fluxo para quantificar as células em processo de autofagia (THOME et al., 2016), observamos que o tratamento aumenta o número de células com conteúdo ácido (percentual de células contidas na fração FL1-FL3) de maneira dose-dependente (Figura 14 A-B). Sobretudo, observamos que o tratamento com linsitinibe induz degradação de p62/SQSTM1 e a conversão de LC3I em LC3II, marcadores moleculares do processo autofágico (Figura 14 C). Adicionalmente, determinamos que o tratamento combinado com linsitinibe e o inibidor da autofagia cloroquina amplifica os efeitos citotóxicos do linsitinibe em monoterapia (Figura 14 D-E).

4.6.4 A inibição farmacológica de IGF1R inibe os efetores das vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK em linhagens de LMA

Molecularmente, linsitinibe diminuiu a fosforilação de IGF1R no sítio de ativação Y1105 de maneira tempo dependente, e em decorrência disso inibe a expressão/ativação de IRS1 e IR2, e os efetores da via IGF1R/IRS, de mTOR, AKT1/2/3, P70S6K e 4EBP1, efetores da via PI3K, e de ERK1/2, efector da via MAPK. Os efeitos citotóxicos do tratamento com linsitinibe foram também demonstrados pela clivagem de caspase 3 e da fosforilação da Histona H2A.X,

um marcador de dano de DNA (**Figura 15**). A avaliação molecular da ativação da autofagia foi confirmada em ensaio tempo-dependente.

Figura 14: Linsitinibe induz autofagia e tem suas atividades antineoplásicas potencializadas pela combinação com a inibição farmacológica da autofagia em linhagens celulares de LMA

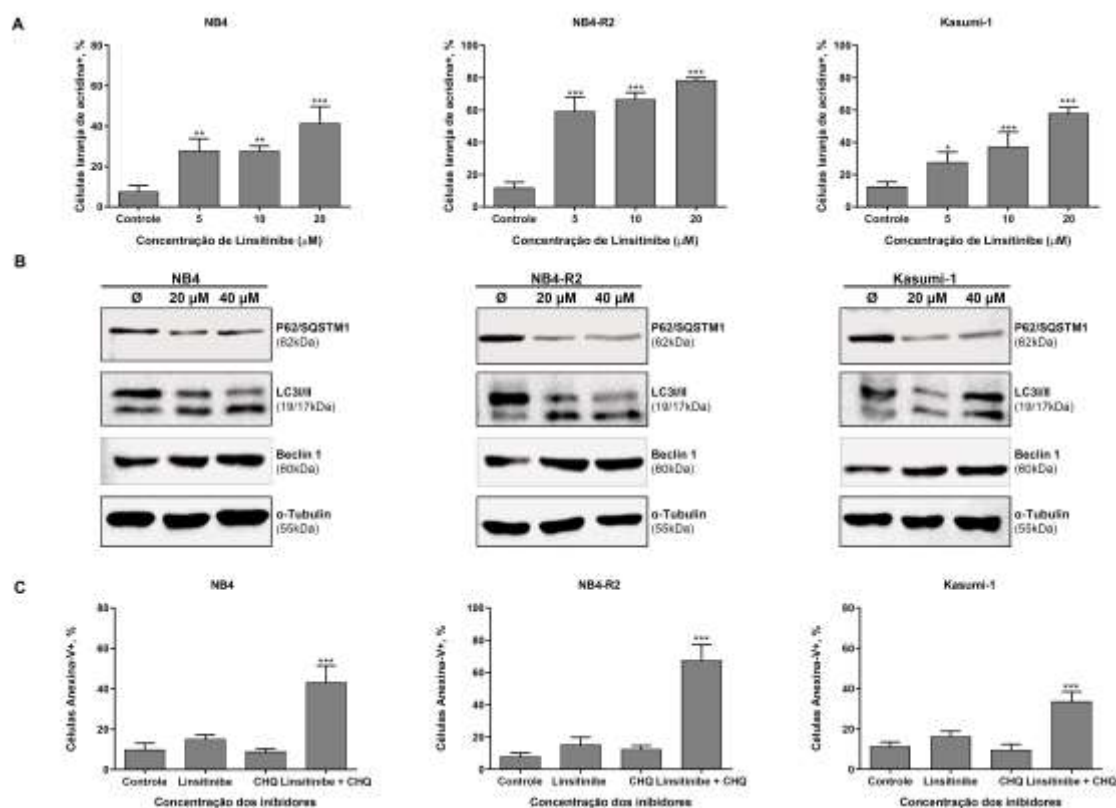


Figura 14 - (A) A autofagia foi determinada por citometria de fluxo em células NB4, NB4-R2 e Kasumi-1 tratadas ou não com linsitinibe durante 72 horas utilizando o método de coloração por laranja de acridina. Gráficos de barras representam a média e desvio padrão de pelo menos quatro experimentos independentes de autofagia e quantificam a fração celular contida *gate*. **(B)** Análise de *Western blot* para os níveis de p62, LC3II e Beclina-1 nos extratos celulares totais de células NB4, NB4-R2 e Kasumi-1 tratadas ou não com linsitinibe; as membranas foram incubadas com anticorpo para detecção da proteína tubulina, e reveladas com o sistema *Supersignal West Dura Extended Substrat system* e Gel Doc XR+. **(C)** A apoptose foi determinada por citometria de fluxo em células NB4, NB4-R2 e Kasumi-1 tratadas ou não com linsitinibe (10μM) e/ou cloroquina (20mM) durante 72 horas utilizando o método de coloração de anexina V/PI. Gráficos de barra representam a média com desvio padrão de ao menos quatro experimentos independentes. Os valores de *P*, linhagens celulares e as doses utilizadas estão indicadas.

Nota: **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001; CHQ: Cloroquina.

Figura 15: O tratamento com linsitinibe modula as vias de sinalização IGF1R/IRS, PI3K/Akt/mTOR e MAPK em linhagens celulares de LMA

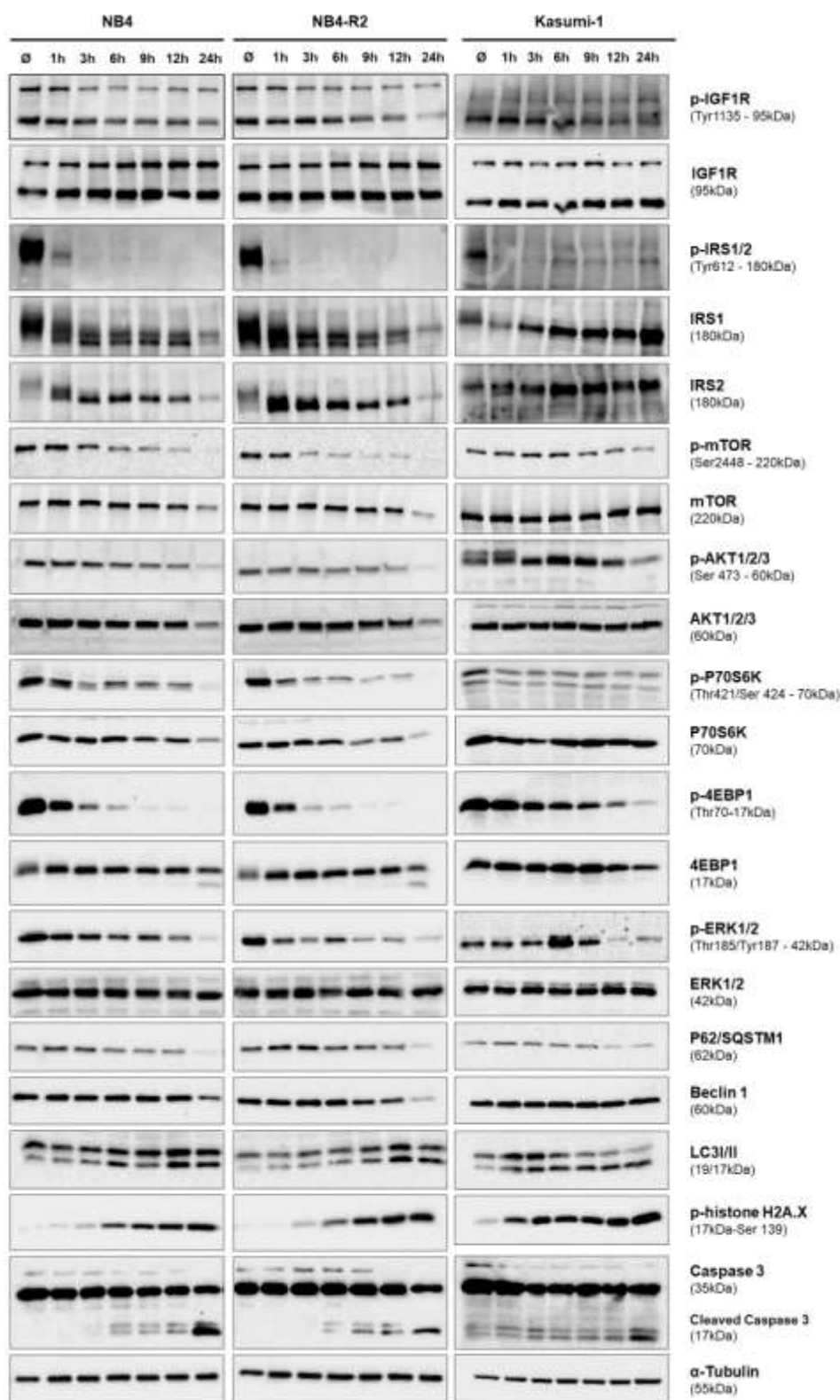


Figura 15 - Análise por *Western blot* dos níveis de p-IGF1R^{Y1135}, p-IRS1/2^{Y612}, p-mTOR^{S2448}, p-AKT1/2/3^{S473}, p-P70S6K^{T421/S424}, p-4EBP1^{T70}, p-ERK1/2^{T183/Y185}, p62/SQSTM1, Beclina 1, LC3II, p-histona H2A.X e caspase 3 (total e clivada) em extratos celulares totais de células NB4, NB4-R2 e Kasumi-1 tratadas ou não com linsitinibe (40 μ M) de maneira tempo-dependente; as membranas foram incubadas com o anticorpo para detecção da respectiva proteína total ou α -tubulina e reveladas com o sistema *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate System* e Gel Doc XR+.

4.77 Investgação de mecanismos moleculares relacionados a expressão diferencial dos componentes da via IGF1R-IRS

A análise de enriquecimento de conjuntos é um método computacional que permite a avaliação de diferenças concordantes de conjuntos gênicos (previamente construídos) com dois estados biológicos. No presente projeto, a avaliação levou em consideração como parâmetros de análise a alta ou baixa expressão, segundo a estratificação pela curva ROC, para os genes *IGF1R*, *IGF2R* em pacientes com LMA do estudo do TCGA.

O método exploratório do GSEA permitiu a descoberta de assinaturas moleculares associadas com a expressão diferencial de *IGF1R* e *IGF2R* (Figura 16). A principal função predita para *IGF2R*, como regulador da via de sinalização mediada pelas citocinas IGF1 e IGF2, é ainda especulativa e limitada a alguns modelos (BERGMAN et al., 2013; IAMS; LOVLY, 2015). Através do GSEA reconhecemos que os conjuntos gênicos negativamente enriquecidos com a expressão de *IGF1R* são semelhantes com aqueles positivamente enriquecidos com a expressão de *IGF2R* (Figura 16A). Isso corrobora com a ideia de *IGF1R* e *IGF2R* desempenharem funções celulares antagônicas, uma vez que suas expressões estão associadas a conjuntos gênicos igualmente antagônicos. Não obtivemos número significativo (n=3) de conjuntos gênicos positivamente enriquecidos com a expressão de *IGF1R*. Os elementos B, D e F da Figura 16 resumizam os processos celulares ranqueados segundo suas frequências para cada gene. Exemplos de gráficos de enriquecimento são demonstrados para cada gene nos elementos C, E e G da Figura 16.

Figura 16: Análise de enriquecimento gênico adiciona novas perspectivas no conhecimento de processos biológicos regulados por *IGF1R* e *IGF2R* em LMA

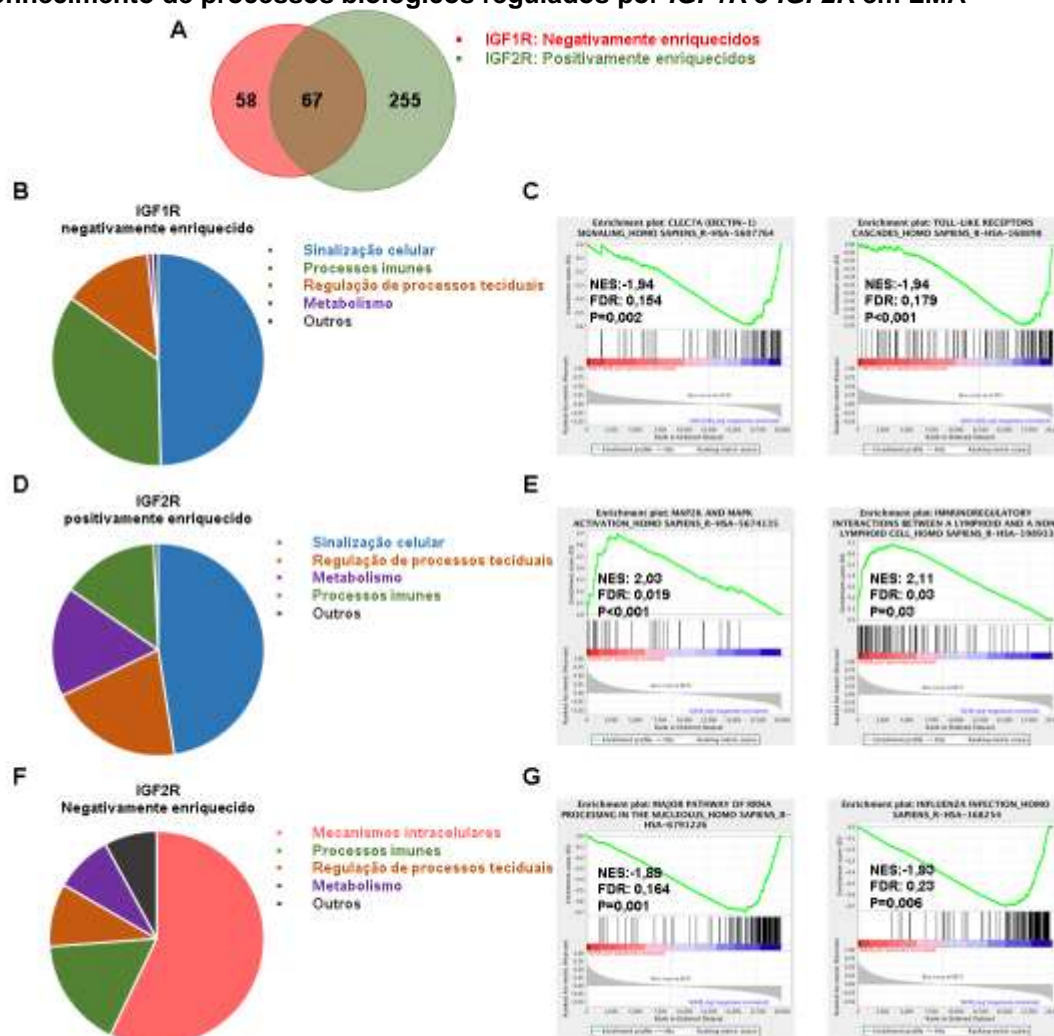


Figura 16 - (A) Diagrama de Venn com o número de assinaturas gênicas negativamente enriquecidas com a expressão de *IGF1R* (verde) e de assinaturas gênicas positivamente enriquecidas com a expressão de *IGF2R* (vermelho) com a respectiva sobreposição entre esses processos ao centro. **(B, D e F)** Gráficos de pizza que resumem os processos celulares associados com a expressão de *IGF1R* ou *IGF2R*. *Reactome signaling* com FDR q-value<0.25 foram incluídos; a proporção para cada categoria está ilustrada em cores diferentes. **(C, E e G)** Gráficos de enriquecimento representativos para os resultados de negativamente enriquecidos com *IGF1R*, positivamente enriquecidos com *IGF2R* e negativamente enriquecidos com *IGF2R*. Os valores de NES, FDR-q-value e P estão indicados.

Nota: NES: índice de enriquecimento normalizado; FDR: taxa de falsa descoberta.

4.8 Impacto prognóstico de *IRS1* e *IRS2* em pacientes com leucemia mieloide aguda

A análise de sobrevida dos pacientes da coorte do TCGA evidenciou que pacientes com alta expressão de *IRS1*, dicotomizados segundo a curva ROC, possuem melhores índices de sobrevida global ($P=0,009$) e sobrevida livre de doença ($p<0,001$) (Figura 17 A e B). A baixa expressão de *IRS1* foi independentemente associada a pior sobrevida livre de doença em pacientes com LMA utilizando idade, contagem de leucócitos ao diagnóstico e risco integrado como confundidores (Tabela 11). A expressão de *IRS2* não foi capaz de prever risco para sobrevida global ($P=0,258$) e sobrevida livre de doença ($P=0,085$) (Figura 17 C e D).

Figura 17: Desfechos clínicos para pacientes com leucemia mieloide aguda de acordo com a expressão de *IRS1*

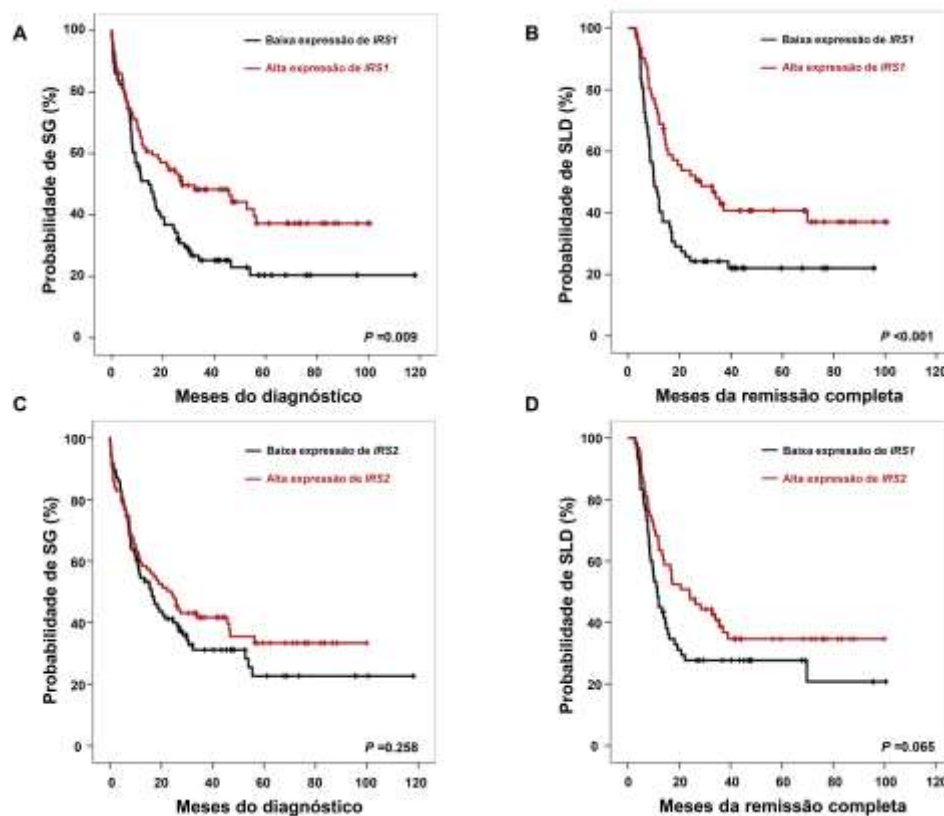


Figura 17 - (A e C) Análise de sobrevida global e **(B e D)** sobrevida livre de doença para pacientes com LMA provenientes do estudo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e disponibilizados *online* no *Cbio portal for cancer genomics*. Pacientes com baixa expressão de *IRS1* apresentam prognóstico desfavorável quanto a sobrevida global e livre de doença (todos $P<0.05$). A expressão de *IRS2* não prediz prognóstico quanto a sobrevida global e livre de doença (todos $P>0.05$). As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.

Tabela 11: Análises univariadas e multivariadas para sobrevida global e sobrevida livre doença para pacientes com LMA do estudo TCGA.

Fatores	Análise univariada					
	Sobrevida livre de doença			Sobrevida Global		
	Hazard Ratio ¹	(95% I.C.)	<i>p</i>	Hazard Ratio ¹	(95% I.C.)	<i>p</i>
Idade	1.01	0.99 – 1.02	0.078	1.03	1.02 – 1.05	<0.001
Risco citogenético						
Alto vs Intermediário vs Baixo	1.69	1.22 – 2.32	<0.001	1.99	1.51 – 2.65	<0.001
Leucócitos (X10⁹/L)	1.01	1.001 – 1.02	0.009	1.01	1.001 – 1.1	0.021
Expressão <i>IRS1</i>						
Variável contínua	0.99	0.98 – 1.003	0.627	0.99	0.99 – 1.001	0.408
Variável categórica	0.51	0.32 – 0.79	0.003	0.61	0.42 – 0.89	0.012
Fatores	Análise multivariada					
	Sobrevida livre de doença			Sobrevida Global		
	Hazard Ratio ¹	(95% I.C.)	<i>p</i>	Hazard Ratio ¹	(95% I.C.)	<i>p</i>
Idade	1.01	0.99 – 1.02	0.072	1.04	1.02 – 1.05	<0.001
Risco citogenético						
Alto vs Intermediário vs Baixo	1.72	1.19 – 2.49	0.003	1.88	1.36 – 2.61	<0.001
Leucócitos (X10⁹/L)	1.006	1.001 – 1.01	0.012	1.01	1.002 – 1.02	0.003
Expressão <i>IRS1</i>						
Variável categórica	0.58	0.34 – 0.94	0.028	0.69	0.46 – 1.05	0.089

Abbreviations: IC: Intervalo de confiança. ¹Hazard ratios >1 indica que o primeiro fator tem pior prognóstico.

Separando os pacientes com LMA disponibilizados pela plataforma *Amazonia!* de acordo com alterações moleculares recorrentes, observamos que a expressão de *IRS2* é maior em pacientes com LPA t(15;17) ($P < 0,001$) e associados a Inv(16) ou t(16;16). A expressão de *IRS1* não foi diferente entre as alterações citogenéticas recorrentes de LMA (Figura 18).

Figura 18: Associação de expressão de *IRS1* e *IRS2* de acordo com alterações citogenéticas recorrentes em LMA

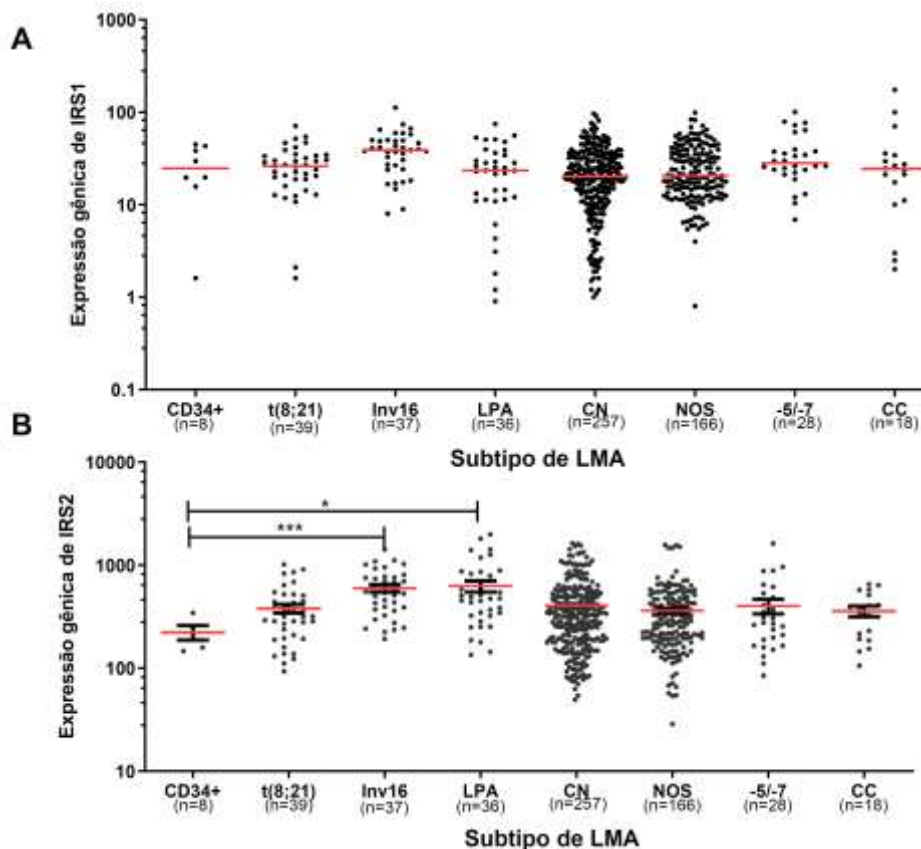


Figura 18 - (A) Gráfico de dispersão de acordo com a expressão de *IRS1*, **(B)** *IRS2* para pacientes com LMA caracterizados através de alterações citogenéticas recorrentes. Os subtipos de LMA e valores de *p* estão indicados; teste de Kruskal-Wallis.

Nota: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

4.9 Investigação da oportunidade terapêutica da inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 em modelos pré-clínicos de LMA

Amostras de pacientes com LMA foram utilizadas para avaliação da eficiência terapêutica do inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2 NT157 *ex vivo*. Para tanto, células mononucleares da medula óssea foram utilizadas para determinação da viabilidade (ensaio de MTT) e apoptose (através de coloração com Anexina V/PI). Também foram utilizadas as linhagens celulares de LMA NB4, NB4-R2, Kasumi-1 e THP-1 para investigação dos efeitos funcionais.

4.9.1 A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 possui efeitos antineoplásicos em células de pacientes com LMA

Amostras de cinco pacientes com LMA foram utilizadas para verificação da atividade antineoplásica *ex vivo* do inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2.

NT157 diminuiu a viabilidade e induziu apoptose de uma maneira dose dependente (Figura 19).

Figura 19: NT157 possui efeitos antineoplásicos em células primárias de pacientes com LMA

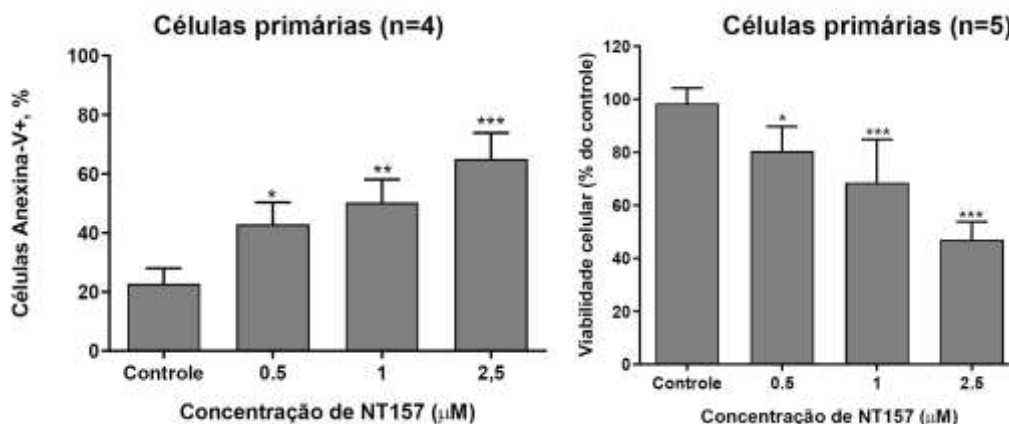


Figura 19 - A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células primárias de pacientes com LMA tratadas ou não com NT157 por 72 horas usando o método de coloração com Annexina V/PI. Os gráficos de barra representam a média com desvio padrão dos resultados de quatro pacientes. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT em células de pacientes com LMA tratadas ou não com NT157 por 72 horas e normalizada por células não tratadas correspondentes. Os gráficos de barras representam a média com desvio padrão de cinco pacientes. Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni

Nota: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.9.2 NT157 reduz a viabilidade de linhagens celulares de LMA

NT157 reduziu a viabilidade celular das linhagens celulares NB4, NB4-R2, Kasumi-1 e THP-1 de maneira dose e tempo-dependente (Figura 20).

Figura 20: A inibição farmacológica de IGF1R diminui a viabilidade celular de linhagens celulares de LMA

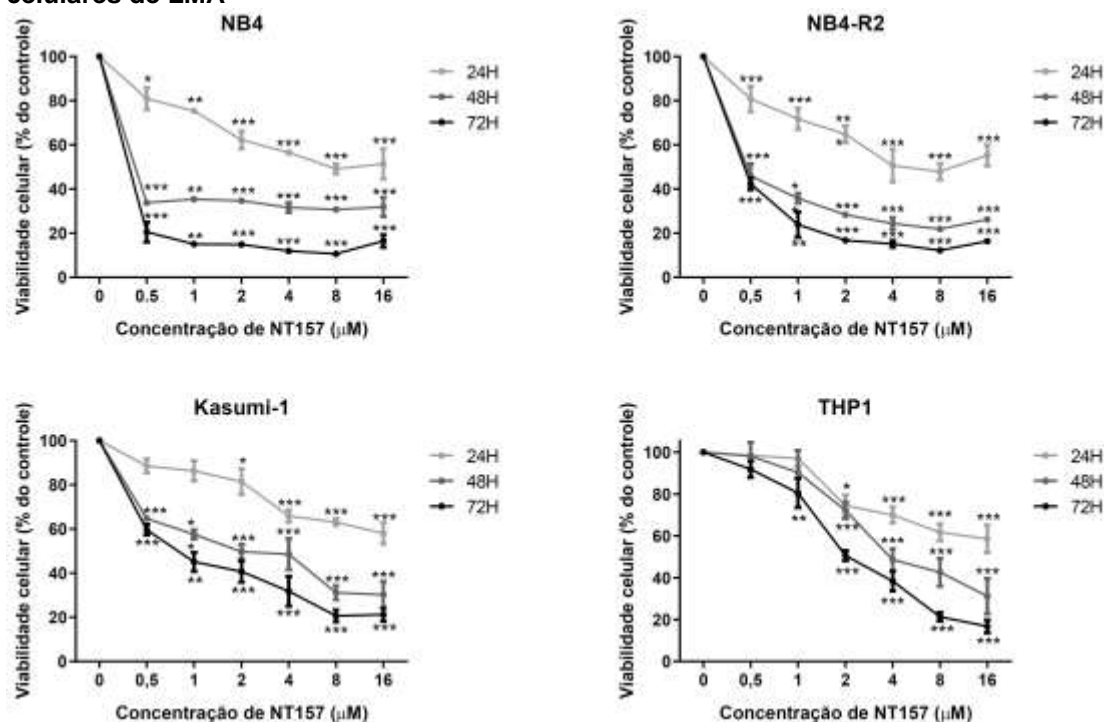


Figura 20 - A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT nas linhagens celulares NB4, NB4-R2, Kasumi-1 e THP-1 tratadas ou não com NT157 por 24, 48 e 72 horas e normalizadas pelas células não tratadas correspondentes. Os gráficos de barras representam a média com desvio padrão de quatro experimentos independentes. Os valores de P , as linhagens celulares e doses estão indicadas nos gráficos. Teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Nota: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.9.3 NT157 induz apoptose em linhagens celulares de LMA

Estimulados pelos resultados anteriores da viabilidade celular, motivamo-nos a investigar se o NT157 induziria apoptose nas linhagens NB4, NB4-R2, Kasumi-1 e THP-1. A inibição farmacológica de IGF1R induziu apoptose nas quatro linhagens em maneira dose dependente (Figura 21).

Figura 21: NT157 induz apoptose em linhagens celulares de LMA

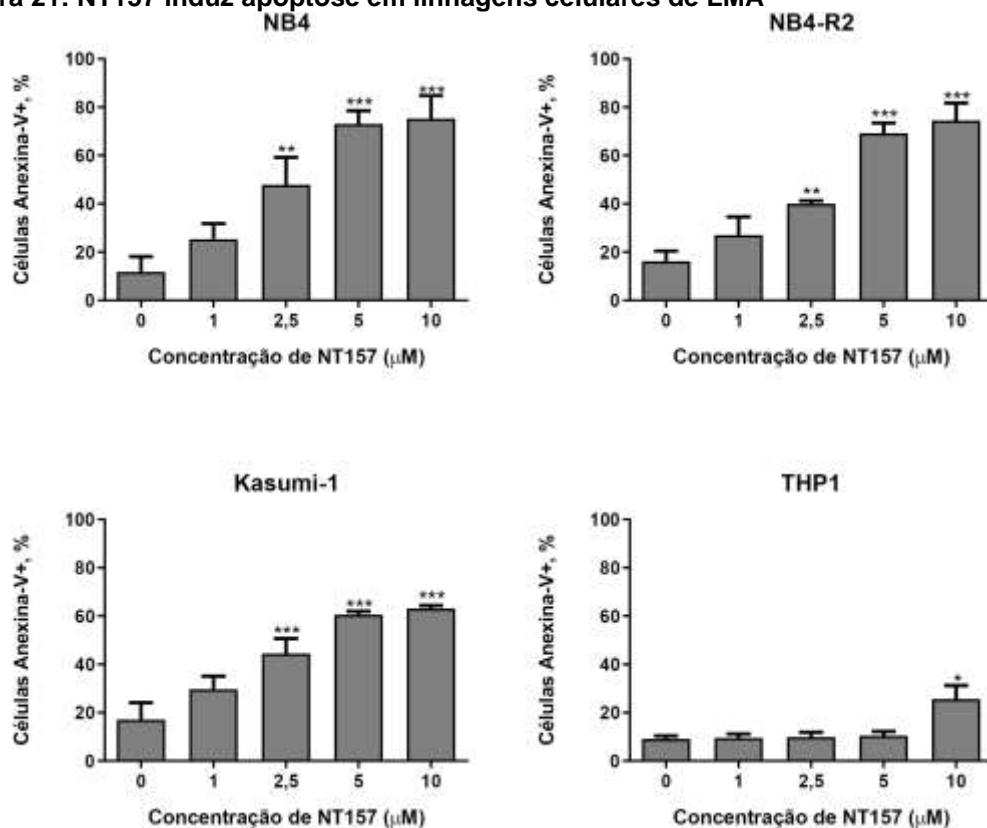


Figura 21 - A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células NB4, NB4-R2, Kasumi-1 e THP-1 tratadas ou não com NT157 por 24 horas usando o método de coloração Annexina V/PI. Os gráficos de barra representam a média com desvio padrão de ao menos quatro experimentos independentes. Os valores de *P*, linhagens celulares e dose de NT157 utilizadas estão indicadas.

Nota: **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001.

4.9.4 NT157 afeta a função mitocondrial em linhagens celulares de LMA

O tratamento com NT157 induziu a produção de ERO total e mitocondrial, aumentou a massa mitocondrial e induziu a despolarização do potencial de membrana mitocondrial (Figura 22). Coletivamente, esses dados sugerem que há envolvimento mitocondrial nos mecanismos de ação do NT157, possivelmente através da indução de apoptose pela via intrínseca mitocondrial.

Figura 22: NT157 afeta a função mitocondrial em linhagens celulares de LMA.

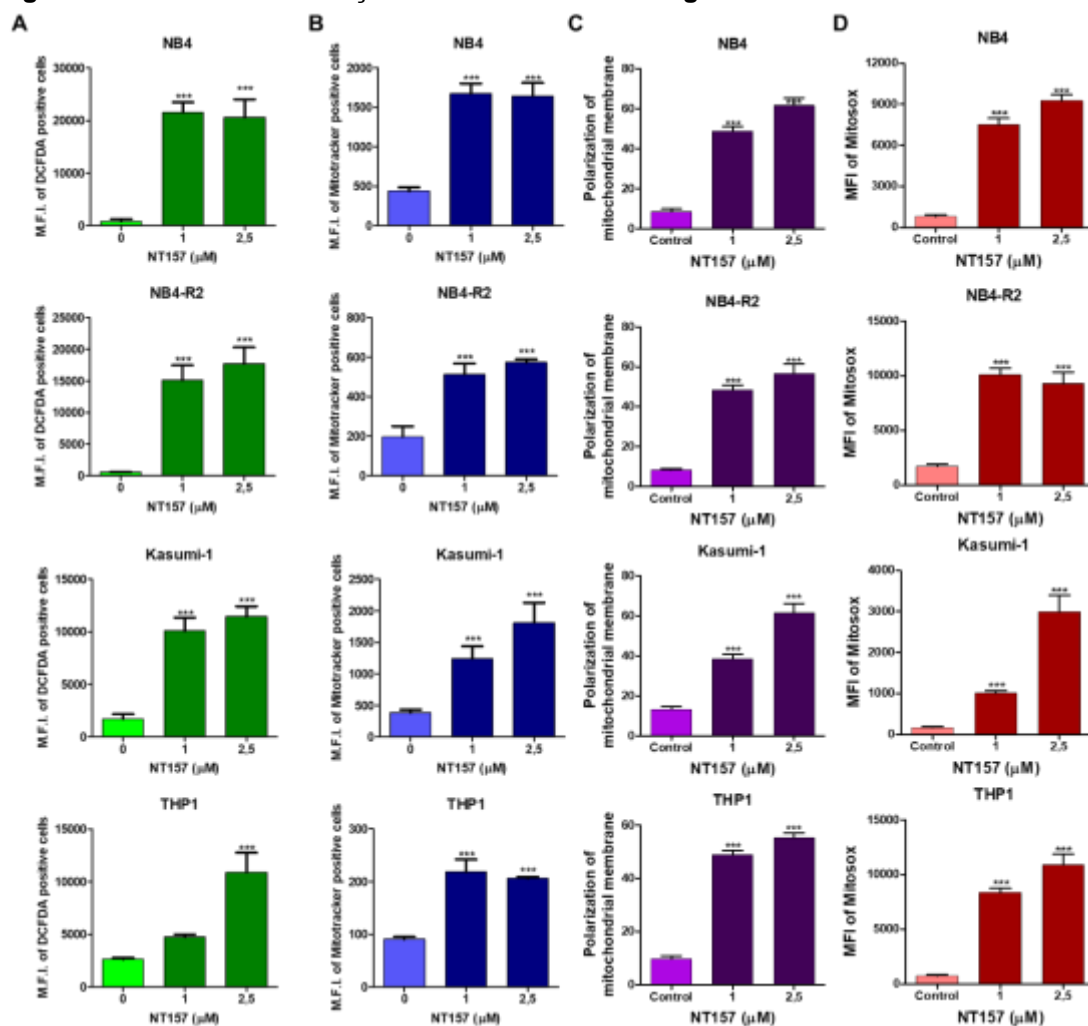


Figura 22 - (A) a produção de ERO total, **(B)** massa mitocondrial, **(C)** potencial de polarização mitocondrial e **(D)** produção de ERO mitocondrial foi determinada por citometria de fluxo em células NB4, NB4-R2, Kasumi-1 e THP-1 tratadas ou não com NT157 durante 24 horas utilizando os reagentes: DCFDA, Mitotracker, JC-1 e Mitosox, respectivamente. Gráficos de barras representam a média e desvio padrão de quatro experimentos independentes para cada uma das reações.

Nota: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; MFI: Intensidade Média de Fluorescência. As linhagens celulares e doses estão indicadas.

4.9.5 A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 inibe as vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK em linhagens de LMA

NT157 diminuiu a fosforilação de IGF1R no sítio de ativação Y1105 de maneira tempo dependente, e em decorrência disso inibiu a expressão/ativação de IRS1 e IR2, efetores da via IGF1R/IRS, de mTOR, AKT, P70S6K e 4EBP1, efetores da via PI3K, e de ERK1/2, efetor da via MAPK. Os efeitos citotóxicos do tratamento com NT157 foram também demonstrados pela clivagem de caspase 3 e da fosforilação da Histona H2A.X mais pronunciados nas linhagens NB4, NB4-R2 e Kasumi-1. Baseado na indução de p-H2A.X, investigamos a ativação do mecanismo de resposta a dano celular AP-1, composto pelos fatores de

transcrição c-fos e c-jun, através dos efetores p-JNK e da MAP quinase de estresse celular p-P38. NT157 rapidamente (a partir de 1 hora) induziu a ativação de P38 e JNK (a partir de 6 horas) (Figura 23).

Figura 23: O tratamento com NT157 modula as vias de sinalização IGF1R/IRS, PI3K/AKT/mTOR e MAPK em linhagens celulares de LMA.

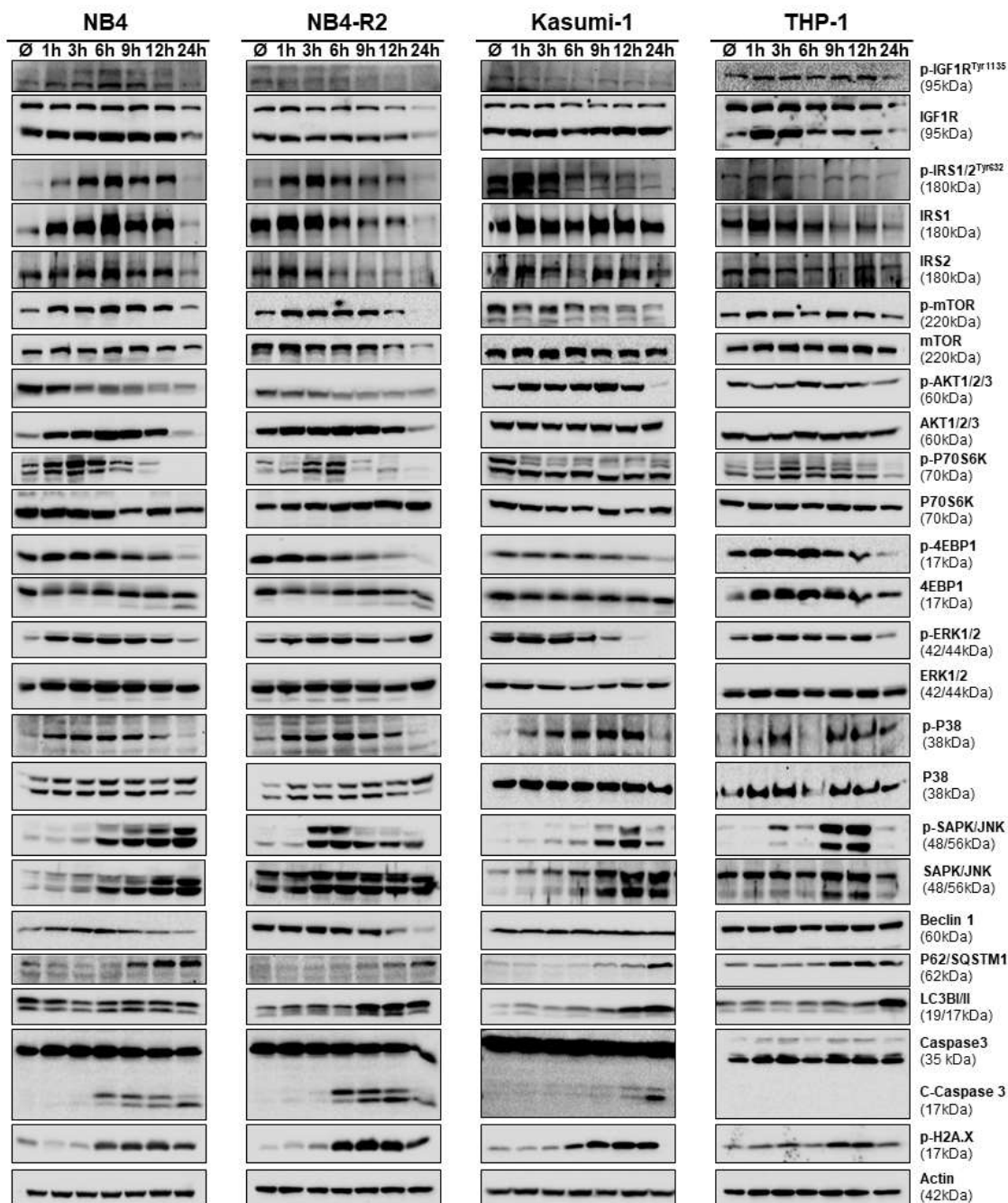


Figura 23 - Análise por *Western blot* dos níveis de p-IGF1R^{Y1135}, p-IRS1/2^{Y612}, p-mTOR^{S2448}, p-AKT1/2/3^{S473}, p-P70S6K^{T421/S424}, p-4EBP1^{T70}, p-ERK1/2^{T183/Y185}, p62/SQSTM1, Beclina 1, LC3BII, p-histona H2A.X e caspase 3 (total e clivada) em extratos celulares totais de células NB4, NB4-R2 e Kasumi-1 tratadas ou não com linsitinibe (40µM) de maneira tempo-dependente; as membranas foram incubadas com o anticorpo para detecção da respectiva proteína total ou actin e reveladas com o sistema *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate System* e Gel Doc XR+.

4.10 Investigação da participação da via de sinalização IGF1R-IRS1/2 na LMA associada a mutações em FLT3

Refinando nossas avaliações entre os grupos molecularmente homogêneos de LMA, iniciamos a investigação da expressão gênica de componentes relacionados a via de sinalização de IGF1R-IRS1/2 nos pacientes incluídos no estudo do TCGA para LMA. Essa avaliação foi inspirada pelo mecanismo fisiopatológico das mutações em FLT3, um receptor com capacidade tiorinoquinase intrínseca, que, hipoteticamente, pode se beneficiar da participação coadjuvante de outras proteínas envolvidas em processos de proliferação celular. Os genes *INSR*, *IGF1R*, *IGF1*, *IGF2*, *IRS1* e *IRS2* foram expressos em níveis inferiores em pacientes com mutação em FLT3 (Figura 24). Os genes de interesse foram também testados para capacidade de predição prognóstica entre os pacientes com mutações em FLT3. Alta expressão de *IGF1R* foi preditor de pior sobrevida livre de doença ($P=0,032$), enquanto os pacientes com baixa expressão de *IRS1* tiveram tendência de piores sobrevida global e sobrevida livre de doença ($P=0,120$; $P=0,057$, respectivamente) (Figura 25).

Figura 24: Associação de expressão de componentes da via de sinalização IGF1R-IRS1/2 de acordo com o status mutacional de FLT3.

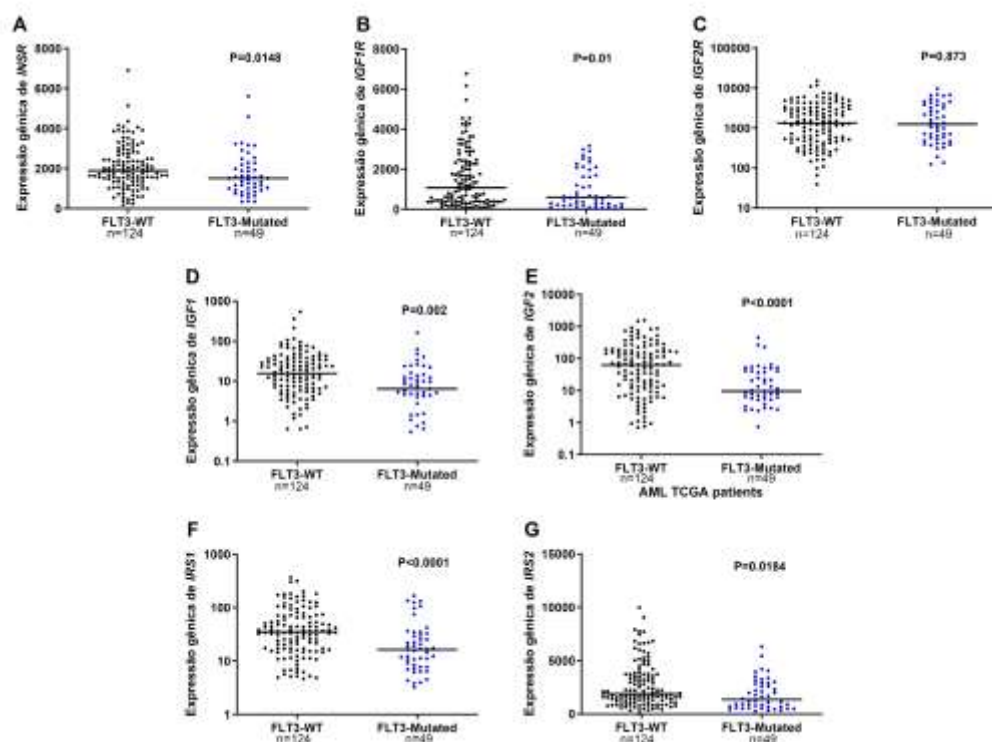


Figura 24 - Gráficos de dispersão de acordo com a expressão de (A) *INSR*, (B) *IGF1R*, (C) *IGF2R*, (D) *IGF1*, (E) *IGF2*, (F) *IRS1* e (G) *IRS2* para pacientes com LMA dicotomizados de acordo com mutação em FLT3. Valores de P estão indicados; teste de Mann-Whitney.

Figura 25: Desfechos clínicos para pacientes com LMA FLT3 mutado de acordo com a expressão de *IGF1R* e *IRS1*

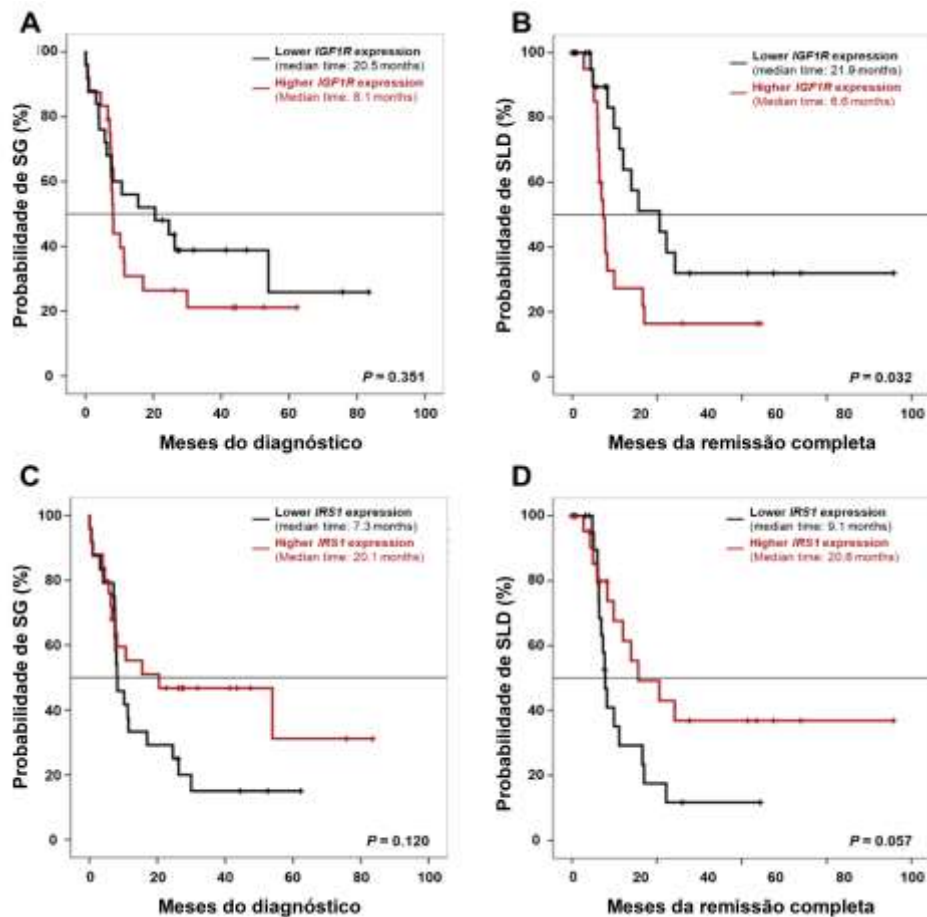


Figura 25 - (A e C) Análise de sobrevida global e **(B e D)** sobrevida livre de doença para pacientes com LMA provenientes do estudo TCGA e disponibilizados *online* no *Cbio portal for cancer genomics*. Pacientes com alta expressão de *IGF1R* (painéis superiores) e baixa expressão de *IRS1* (painéis inferiores) apresentam prognóstico desfavorável quanto a sobrevida livre de doença. As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank. Valores de *P* estão discriminados na figura.

4.11 Investigação pré-clínica da inibição farmacológica da via de sinalização IGF1R-IRS1/2 em modelos celulares de LMA associadas a mutação em FLT3

A investigação da participação funcional da via IGF1R-IRS1/2 como modificador clínico da LMA associada a mutação em FLT3, bem como sua inibição como estratégia terapêutica foi também tema de nosso interesse. Demonstramos previamente que os componentes da via IGF1R-IRS1/2 tem expressão reduzida e que a expressão aumentada de *IGF1R* e diminuída de *IRS1* prediz prognóstico desfavorável quanto a sobrevida livre de doença em LMA FLT3^{MUT}. Apresentaremos os ensaios funcionais e vias de sinalização moduladas pela inibição de IGF1R-IRS1/2 nas linhagens celulares Molm13 e MV4;11.

4.11.1 A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 desempenha efeito antineoplásico em linhagens celulares de LMA FLT3^{MUT}

Utilizamos os inibidores linsitinibe, inibidor tirosinoquinase de IGF1R/IR, e NT157, inibidor alostérico de IGF1R-IRS1/2. A Figura 26A reflete a curva dose resposta para os inibidores nas linhagens Molm13 e MV4;11. Ambos os inibidores foram citotóxicos de maneira dose- e tempo dependente. As concentrações inibitórias de 50% estão ilustradas. A seguir, exploramos se a exposição por 24 horas a linsitinibe e NT157 seriam capazes de induzir apoptose em monoterapia ou em associação com os inibidores de FLT3 midostaurin ou quizartinibe (Figura 26B). NT157 foi notavelmente mais eficiente em induzir apoptose que linsitinibe e que os inibidores de FLT3 em ambas as linhagens ($P<0.05$). Linsitinibe 10 μ M e NT157 1 μ M apresentaram efeito aditivo a inibição farmacológica combinada com quizartinibe ($P<0,05$).

Figura 26. A inibição farmacológica de IGF1R-IRS1/2 tem efeitos citotóxicos em linhagens celulares de LMA com FLT3 mutado.

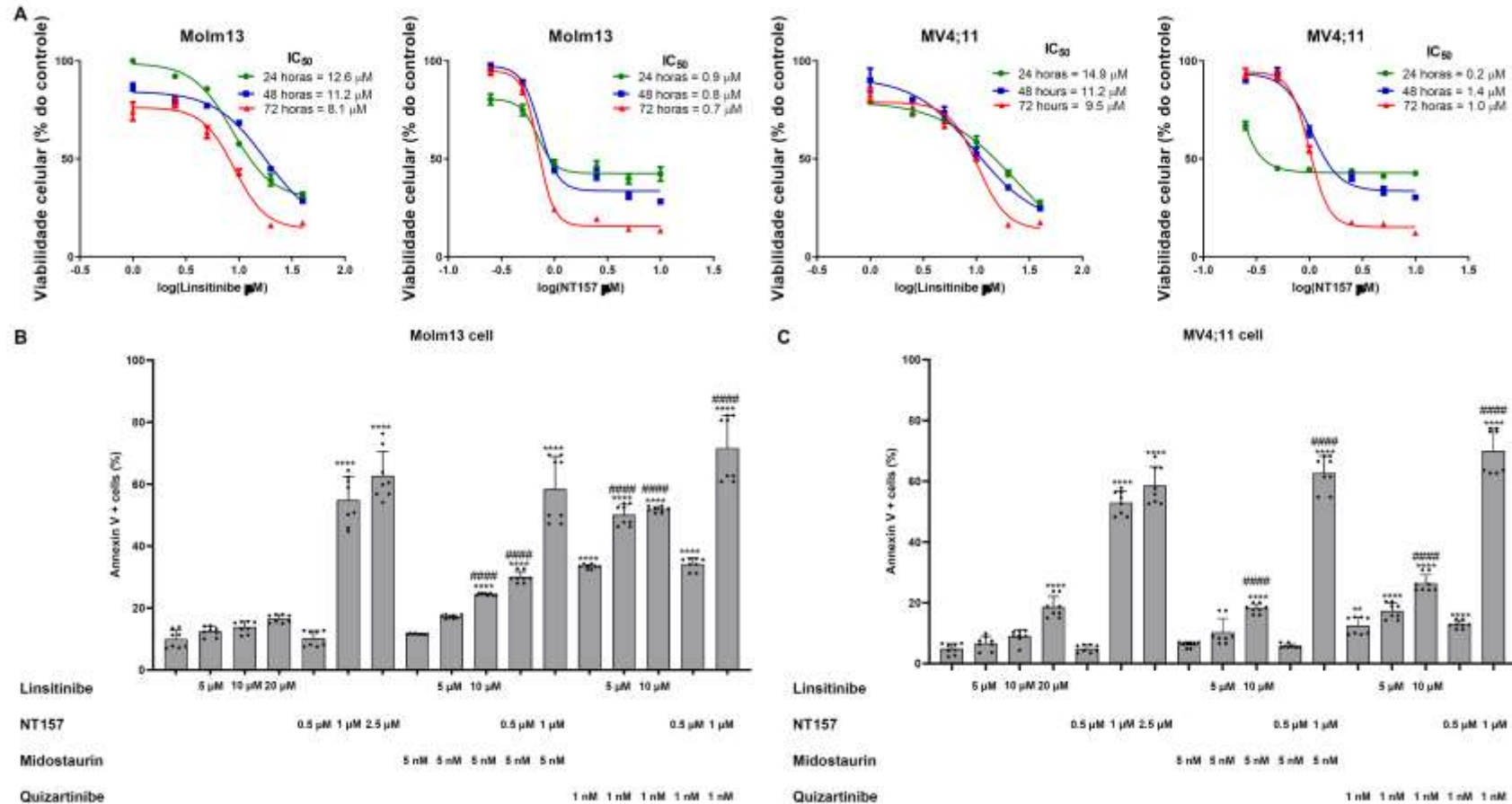


Figura 26 - (A) A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT nas linhagens Molm13 e MV4;11 tratadas ou não com linsitinibe ou NT157 por 24, 48 e 72 horas e normalizadas pelas células não tratadas correspondentes. As curvas de dose-resposta representam a média com desvio padrão de quatro experimentos independentes. O IC_{50} foi determinado por regressão linear. **(B)** A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células Molm13 e MV4;11 tratadas ou não com linsitinibe, NT157, midostaurin e/ou quizartinibe por 24 horas utilizando o método de Anexina V/PI. Os gráficos de barra representam a média com desvio padrão de quatro experimentos independentes. Os valores de P estão indicados.

Nota: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.11.2 A inibição farmacológica de FLT3 inibem vias de crescimento celular

Os inibidores farmacológicos de FLT3 midostaurin e quizartinib reduziram a fosforilação de FLT3 no sítio de ativação Y591 de maneira dose dependente, bem como reduziram a ativação da via Akt/mTOR e STAT5 (Figura 27). Ambos os inibidores aboliram a fosforilação de IGF1R em Y1135 e a expressão de IRS1 nas linhagens Molm13 e MV4;11, assim como diminuíram a expressão de BCL-xL. Similarmente ao observado com o linsitinibe, os inibidores de FLT3 induziram autofagia, conforme demonstrado pelo acúmulo de Beclin-1 e degradação de p62 (Figura 27).

4.11.3 IGF1R-IRS1/2 interferem em vias de sinalização de crescimento celular

Os inibidores de IGF1R-IRS1/2 linsitinibe e NT157 foram capazes de inibir a fosforilação de IGF1R em seu sítio de ativação Y1135, bem como reprimiram IRS1/2 de maneira tempo dependente (Figura 28). Ambos os inibidores foram capazes de reprimir a ativação de STAT5, principal efetor de FLT3 mutado, mas apenas o NT157 reduziu a ativação e expressão de FLT3. Enquanto o linsitinibe induziu autofagia, conforme demonstrado pela ativação de mTORC2, demonstrado pelo aumento da fosforilação de Rictor, ativação de ULK1, aumento da expressão de Beclin1 e degradação de P62, NT157 demonstrou sua superioridade citotóxica através da indução do complexo AP-1 (p-SAPK/JNK) e de MAPK de estresse celular (P38), bem como clivagem de Caspase 3 proeminentemente maior que linsitinibe. Com a finalidade de comparar diretamente os mecanismos envolvidos nos processos moleculares regulados por linsitinibe e NT157 nas linhagens celulares com mutação em FLT3, realizamos um estudo de proteômica global livre de marcação em colaboração com os professores Vítor Marcel Faça da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Marcus Bustamante Smolka da Cornell University. Os dados estão sendo minerados no momento da conclusão da tese e serão incorporados ao artigo científico.

Figura 27. A inibição farmacológica de FLT3 modula as vias IGF1R/IRS, PI3K/Akt/mTOR em linhagens celulares de LMA com FLT3 mutado.

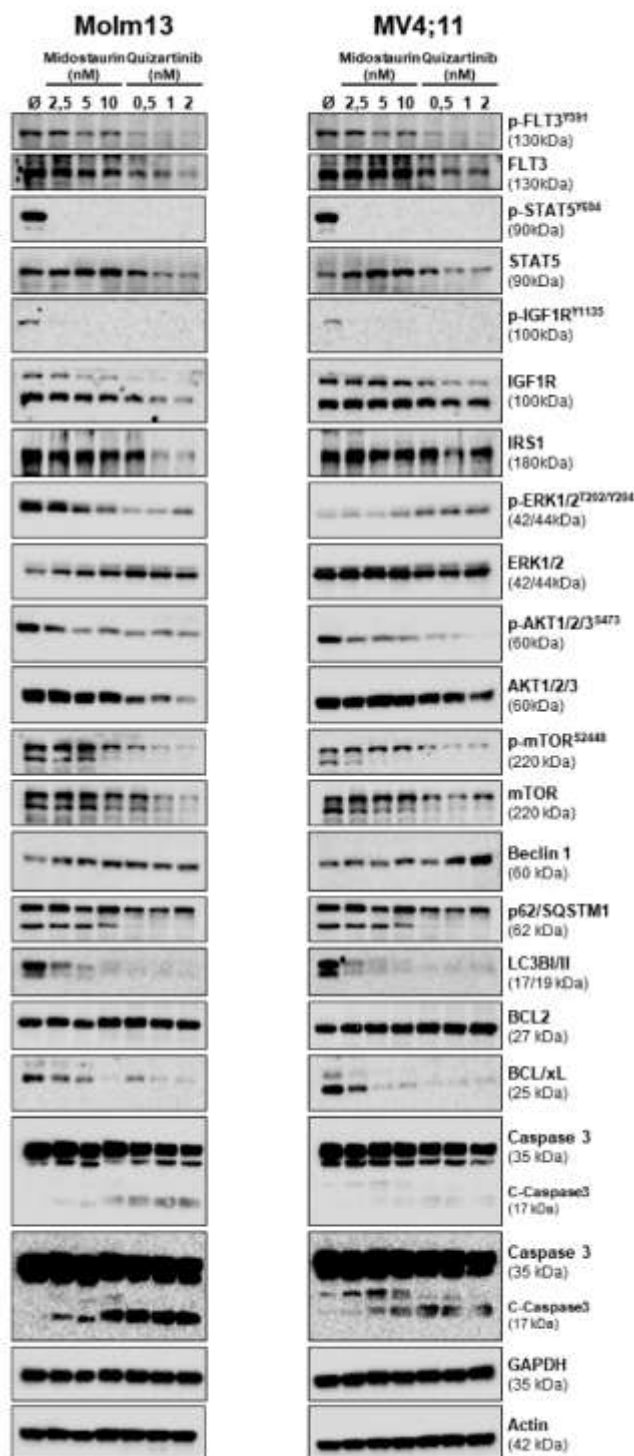


Figura 27 - Análise por Western blotting dos níveis de p-FLT3^{Y591}, p-STAT5^{Y594}, p-IGF1R^{Y1135}, p-mTOR^{S2448}, p-AKT1/2/3^{S473}, p-ERK1/2^{T183/Y185}, IRS1, p62/SQSTM1, Beclin-1, LC3B/II, BCL2, BCL-xL e caspase 3 (total e clivada) em extratos celulares totais de células Molm13 e MV4;11 tratadas ou não com Midostaurin ou Quizartinibe (24h) de maneira dose-dependente; as membranas foram incubadas com o anticorpo para detecção da respectiva proteína total ou GAPDH ou ACTIN e reveladas com o sistema SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate System e Gel Doc XR+.

Figura 28. O tratamento com inibidores de IGF1R-IRS1/2 tem efeitos em diversos processos celulares em linhagens de LMA com FLT3 mutado.

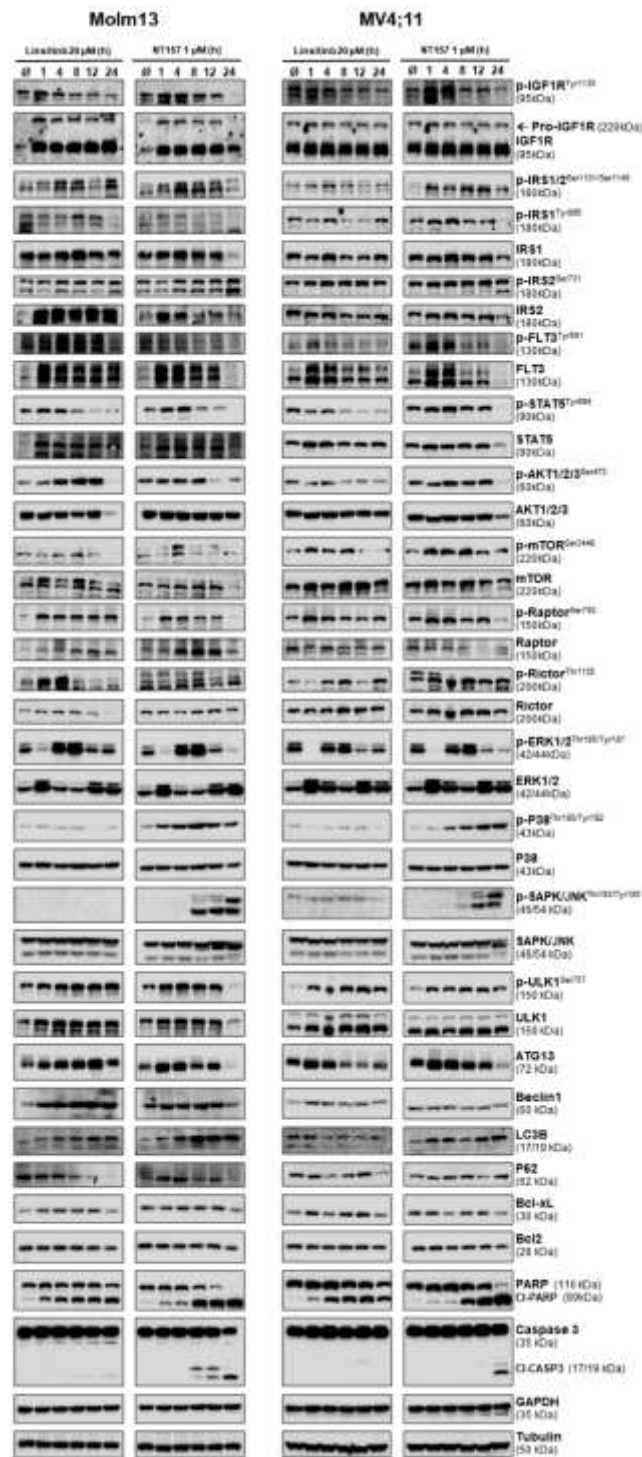


Figura 28 - Análise por Western blot dos níveis de p-IGF1R^{Y1135}, p-IRS1/2^{S1101/1149}, p-IRS1^{Y895}, p-IRS2^{S731}, p-FLT3^{Y591}, p-STAT5^{Y694}, p-mTOR^{S2448}, p-AKT1/2/3^{S473}, p-Raptor^{S792}, p-Rictor^{T1135}, p-ERK1/2^{T183/Y185}, p-P38^{T180/Y182}, p-SAPK/JNK^{T183/Y185}, p-ULK1^{S757}, ATG13, p62/SQSTM1, Beclin-1, LC3I/II, BCL-xL, BCL2, PARP e caspase 3 (total e clivada) em extratos celulares totais de células Molm13 e MV4;11 tratadas ou não com linsitinbe (20 μM) ou NT157 (1 μM) de maneira tempo-dependente; as membranas foram incubadas com o anticorpo para detecção da respectiva proteína total ou GAPDH ou Tubulina e reveladas com o sistema *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate System* e Gel Doc XR+.

5. DISCUSSÃO

A compreensão sobre a fisiopatologia das neoplasias mieloides tem sido objeto de grande interesse acadêmico e médico, especialmente em virtude das necessidades clínicas não atendidas. O tratamento de pacientes com leucemia mieloide aguda é frustrante, com escassas opções terapêuticas e resultados clínicos insatisfatórios; a história natural das síndromes mielodisplásicas não foi alterada a despeito do conhecimento da fisiopatologia molecular das entidades e aprimorar a estratificação de risco permanece relevante para proposição de terapias ajustadas ao risco, enquanto as neoplasias mieloproliferativas ainda se constituem em uma condição clínica limitante em razão da carga de sintomas constitucionais. É necessário, portanto, ampliar as iniciativas de investigação que objetivem elucidar mecanismos não explícitos a fim de lançar luz à novas oportunidades terapêuticas e ferramentas clinicamente úteis. No desenvolvimento do presente projeto, utilizamos a estratégia de reposicionamento de drogas e investigamos os efeitos da metformina em modelo murino de NMP JAK2V617F; através de análise transcriptômica, propusemos um índice prognóstico para pacientes com SMD; e investigamos a oportunidade terapêutica de inibidores da via de IGF1R-IRS1/2 em modelos pré-clínicos de LMA.

O reposicionamento de drogas tem o objetivo de identificar novos usos para drogas aprovadas ou experimentais fora do escopo da indicação médica original. Como vantagens, o reposicionamento possui risco de falha menor e encurta o tempo de implementação, uma vez que geralmente já foi testado em modelos pré-clínicos e possui dados de estudos clínicos de fase 1 e 2, resultando em menos investimentos (ASHBURN; THOR, 2004; PUSHPAKOM et al., 2018).

A metformina é considerada um composto promissor para aplicações outras além de como hipoglicemiante (CORSELLO et al., 2020; YU et al., 2019). Nosso grupo de pesquisa determinou que a metformina foi citotóxica e comprometeu a respiração mitocondrial em modelos celulares com mutação em JAK2V617F (MACHADO-NETO et al., 2018). Molecularmente, a metformina afetou vias de sinalização relacionadas a progressão do ciclo celular e proliferação, entretanto, a dependência da ativação de AMPK é controversa (KAWASHIMA; KIRITO, 2016). Em modelos murinos, metformina reduziu a proliferação tumoral induzido por Ba/F3 JAK2V617F e reduziu a esplenomegalia em modelo de PV. Dois estudos clínicos brasileiros estão investigando os benefícios da metformina em

monoterapia para pacientes com mielofibrose quanto a capacidade de redução da esplenomegalia (MetforMF; Rebec: #RBR-5g38dt) ou como agente antifibrótico (FibroMet; #RBR-52ty66). Resultado de análise de íterim do estudo FibroMet sugerem que o tratamento com metformina reduziu o grau de fibrose da medula óssea dos pacientes (CAMPOS et al., 2019). A função da metformina como agente modulador de fibrose foi determinada em outros tecidos, tais como pulmão, fígado, rim e coração (CAVAGLIERI et al., 2015; RANGARAJAN et al., 2018; SHANKARAIHAH et al., 2019; XIAO et al., 2010). O modelo murino utilizado no presente trabalho não permite a avaliação do desenvolvimento de fibrose da medula óssea (MULLALLY et al., 2010).

A redução da esplenomegalia foi validada em nosso segundo conjunto de experimentos totalmente refeitos. A esplenomegalia representa uma importante condição clínica para os pacientes com NMP (HARRISON, 2010; SPIVAK, 2017; TEFFERI, 2018) e está associada ao desenvolvimento de outros sintomas como a sensação de plenitude gástrica e consequente perda de peso (GEYER et al., 2014). O desenvolvimento de esplenomegalia nas NMP está diretamente relacionado a hematopoiese extramedular causada pelo tráfico de células hematopoiéticas clonais em razão do microambiente alterado da medula óssea (SONG; PARK; UHM, 2018). Diversos dados identificam a participação de diversas citocinas com o desenvolvimento de esplenomegalia. A expressão do fator de células tronco em células endoteliais e estromais positivas para Tcf21 da polpa vermelha do baço induziu esplenomegalia em modelo murino (INRA et al., 2015). Analogamente, a presença do fator de necrose tumoral α aumenta a expansão de células JAK2V617F e do tamanho do baço (FLEISCHMAN et al., 2011). Sobretudo, as citocinas fibrogênicas, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento transformante β e fator de crescimento de fibroblasto, são envolvidas no desenvolvimento tanto da mielofibrose quanto da hematopoiese extramedular (LATAILLADE et al., 2008; LE BOUSSE-KERDILÈS; MARTYRÉ, 1999). Em nosso modelo, foi possível determinar que os animais tratados com metformina apresentaram menor frequência de precursores eritroides precoces (mais imaturos), e, proporcionalmente, maior frequência dos elementos finais da diferenciação. Os efeitos da metformina na modulação de citocinas envolvidas no processo de hematopoiese extramedular será objetivo de estudos futuros de nosso grupo de pesquisa.

O principal objetivo do novo conjunto de experimentos foi determinar os efeitos do tratamento com metformina no conjunto de células tronco e progenitoras hematopoiéticas, responsáveis pela manutenção do fenótipo e que servem como reservatório para evolução clonal. Os animais tratados com metformina apresentaram frequência diminuída do conjunto de CTPH em virtude da redução de progenitores multipotentes. Esse dado pode justificar a redução da capacidade de formação de colônia *ex vivo*. Em contraste, Zhang e colaboradores demonstraram em modelo murino de falência de medula óssea nocaute para *Fanc2* que o tratamento com metformina aumentou a frequência de CTPH e melhorou os parâmetros hematológicos (ZHANG et al., 2016). Em nosso modelo, o tratamento com metformina reduziu a contagem de plaquetas sem afetar outros parâmetros hematológicos.

Os dados de PCR-Array identificaram 30 genes com expressão diminuída e 47 genes com expressão aumentada em células Kit positivas de animais tratados com metformina. Consistente com nosso dado prévio, a metformina reduziu a expressão de *Ccnd1* e *E2f3* e aumentou a expressão de *Cdkn1a*, reforçando seu efeito na progressão do ciclo celular (MACHADO-NETO et al., 2018). O tratamento com metformina aumentou a expressão de importantes componentes antiapoptóticos e da família Bcl2, tais como *Xiap*, *Bcl2l11*, *Bcl2l2* e *Bcl2l10*, enquanto induziu a expressão dos componentes pró-apoptóticos *Fas* e *Faslg*. Coletivamente, os dados sugerem que o tratamento com metformina pode limitar a capacidade de autor-renovação e diferenciação de células Kit no modelo estudado. A implicação de elementos reguladores da progressão do ciclo celular foi identificada previamente como potencial vulnerabilidade nas NMP. A deleção de *Cdk6* atenuou o fenótipo de NMP induzida por *Jak2V617F* através da diminuição da produção de NF- κ B (URAS et al., 2019) e a deleção de *Hdac11*, mas não de *Hdac6*, afetou a progressão do ciclo celular de progenitores hematopoiéticos em modelos murinos de NMP (YUE et al., 2020). Recentemente, foi demonstrado que a metformina é particularmente eficaz em modelos de câncer colorretal associados a mutação em KRAS em um mecanismo dependente da repressão da expressão da bomba de drogas MATE1 (XIE et al., 2020). Em virtude das similaridades moleculares compartilhadas pelas mutações em JAK2 e Ras, é concebível que mecanismos análogos sejam induzidos pelas mutações fenotípicas de NMP, adicionando um efeito potencializado para as células clonais.

Como produto do desenvolvimento do presente trabalho, desenvolvemos um índice prognóstico para pacientes com SMD baseado na expressão de 5 genes relacionados a energética celular (COELHO-SILVA et al., 2021). Apesar da ampla utilidade clínica do IPSS-R para estratificação de risco em SMD (GREENBERG et al., 2012), refinar sua capacidade prognóstica com informações clínicas adicionais, imunofenotipagem ou mutações tem sido de grande interesse (ALHAN et al., 2016; BEJAR et al., 2011; BRAVO et al., 2014; TEFFERI et al., 2017b). O MBS discriminou pacientes em três grupos com desfechos distintos e refinou a estratificação para os pacientes de risco muito baixo e baixo do IPSS-R. Há outros 2 índices de risco prognóstico baseado em expressão gênica para pacientes com SMD, entretanto, como ambos os estudos utilizaram células totais da medula óssea, a tradução para conhecimento da fisiopatologia da SMD é limitada (THOL et al., 2012; YAO et al., 2017). Em nosso índice prognóstico, a desregulação de expressão de ao menos 2 genes é suficiente para identificar os pacientes com risco desfavorável independentemente de idade, sexo e categoria IPSS-R. É digno de nota que, apesar da dificuldade em implementar metodologias baseadas em expressão gênica no contexto clínico, algumas iniciativas obtiveram sucesso em estabelecer protocolos de testes moleculares validados para estratificação de risco em outras neoplasias mieloides (NG et al., 2016; NOMDEDÉU et al., 2017).

O alto grau de complexidade molecular da SMD representa um desafio para definir apropriadamente a contribuição de cada alteração molecular na fisiopatologia de cada entidade. A capacidade preditiva do MBS em todo espectro de entidades e categorias de risco indica que as alterações moleculares fundadoras da SMD resultam em reprogramação metabólica e são eficientemente identificados pelas categorias do MBS. Em concordância, as entidades do MBS apresentam diferentes programas transcricionais associados a aumento da capacidade de respiração mitocondrial, síntese de proteínas e a progenitores hematopoiéticos mais maduros nos pacientes com risco favorável e intermediário em comparação aos pacientes com risco adverso. Assinatura transcricional associada a indiferenciação de CTPH foi determinada como importante preditor de curso clínico desfavorável em LMA (NG et al., 2016). De maneira consistente, já foi demonstrado que progenitores hematopoiéticos mais maduros possuem aumento do consumo basal de oxigênio, produção de ATP e capacidade respiratória mitocondrial em comparação a células mais imaturas (DE ALMEIDA et al., 2017). É concebível

propor, portanto, que pacientes com risco aumentado segundo o MBS possuem células CD34+ mais indiferenciadas, redução da capacidade de respiração mitocondrial e atraso na progressão do ciclo celular, resultando em retardo na hematopoiese, citopenias mais graves e acúmulo de blastos na medula óssea.

O compartimento de células CD34+CD123+ foi demonstrado como sendo responsável pela manutenção e expansão clonal e se constitui em um conjunto primitivo de células tronco. A contraparte CD34+CD123- possui características metabólicas distintas, com diminuição da maquinaria de síntese proteica e da capacidade de fosforilação oxidativa (STEVENS et al., 2018). Nossos dados indicam que os pacientes com risco menor segundo o MBS possuem ativação desses processos moleculares. Entretanto, como todos os pacientes incluídos no estudo de Stevens e colaboradores foram de alto risco, elaboramos a hipótese que a reprogramação metabólica em células CD123+ ocorre diferente entre pacientes com baixo ou alto risco. Adicionalmente, a expressão ectópica de mutantes de SF3B1 em células de mama foi associada com diminuição da capacidade de respiração mitocondrial (BRIAN DALTON et al., 2019). SMD com mutação em SF3B1 é atualmente proposta como sendo um subtipo específico e os pacientes possuem prognóstico favorável (MALCOVATI et al., 2020). Os pacientes com risco favorável pelo MBS foram associados com presença de mutações em SF3B1 e possuem assinatura molecular associada a fosforilação oxidativa. Entretanto, os efeitos da mutação em SF3B1 podem ser dependentes do contexto celular e as consequências metabólicas das mutações em SF3B1 permanecem como de grande importância.

A validação de um novo modelo prognóstico deve ser, sempre que possível, realizado em um conjunto de dados diferente. Entretanto, a validação externa não é possível em algumas situações. A coorte utilizada para o desenvolvimento deste objetivo do projeto possui algumas particularidades, entre as quais destacam-se: dados transcriptômicos de microarranjo de células CD34+ e disponibilidade de dados clínicos, demográficos e moleculares adicionais para as análises de desfecho (GERSTUNG et al., 2015). Realizamos o método de validação interna por reamostragem com Bootstrap para avaliar ambas a acurácia da capacidade preditiva e de sobreajuste dos dados. Os dados indicam dados de desfechos virtualmente idênticos entre a coorte original e da reamostragem. Este método tem sido utilizado em diversos contextos em que não é possível validar os

dados externamente (MARCUS; FIELD, 2017; MULLER; JOHANSSON; BRENNAN, 2017; SUTHANTHIRAN et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro na investigação da participação da via de sinalização de IGF1R-IRS1/2 no contexto das neoplasias hematológicas (TRAINA et al., 2003). Mais recentemente, investigamos a participação funcional dos componentes da via nos processos fisiológico de hematopoiese ou patológico em SMD e NMP, assim como a participação não canônica de IRS1 na regulação das expressão gênica de oncogenes em leucemia linfóide aguda (LLA) (CAMPOS et al., 2016; FERNANDES et al., 2017; MACHADO-NETO et al., 2011, 2012). Com a demonstração da relevância da via em diferentes contextos celulares e moleculares para as neoplasias hematológicas, nosso grupo investigou a capacidade antineoplásicos dos inibidores farmacológicos da via em modelos pré-clínicos de NMP, LLA e leucemia mieloide crônica (FENERICH et al., 2020; RODRIGUES ALVES et al., 2019; SCOPIM-RIBEIRO et al., 2021). A importância da ativação de IGF1R para manutenção da célula tronco da LMA e como responsável pela ativação da via de PI3K/Akt em blastos da LMA foi previamente investigada (CHAPUIS et al., 2010; TAMBURINI et al., 2007; XU et al., 2018). Com o desenvolvimento do presente projeto nós investigamos os efeitos antineoplásicos dos inibidores de IGF1R-IRS1/2 em modelos celulares de LMA assim como a associação clínica da expressão dos genes da via com os desfechos clínicos e processos moleculares em dados transcriptômicos.

A expressão aumentada de IGF1R foi identificada como preditora de prognóstico desfavorável em diversos tipos de câncer, especialmente tumores sólidos (AL-SAAD et al., 2017; ALEKSIC et al., 2017; BECKER et al., 2016; WANG et al., 2018). Em LMA, a expressão de IGF1R foi associada a ativação da via de PI3K/Akt (CHAPUIS et al., 2010). A função de IGF2R é bem menos investigada que a de IGF1R em ambos os contextos fisiológico e patológico. O conceito mais amplamente difundido é o de que o IGF2R exerce controle negativo sobre a ativação de IGF1R por IGF2. Neste sentido, IGF2R se liga a IGF2 e induz a degradação lisossomal do complexo receptor/fator de crescimento, sem possuir atividade catalítica intrínseca (IAMS; LOVLY, 2015). Em razão disso, sugere-se IGF2R como supressor tumoral, tendo sido sua expressão associada a melhores desfechos clínicos em pacientes com câncer de pulmão, cervical, carcinoma hepatocelular e bexiga (LAUTEM et al., 2019; LIU et al., 2020; TAKEDA et al., 2019;

TIAN et al., 2014). Nosso estudo demonstrou de maneira original que a razão de expressão gênica de IGF1R/IGF2R possui capacidade preditiva superior aos genes individualmente em LMA e LPA para desfechos clínicos.

A inibição de vias relacionadas aos mecanismos que conferem vantagem proliferativa as células neoplásicas suporta o conceito de terapia complementar mais eficaz. Em LMA, especial atenção tem sido dada a inibição da via PI3K/Akt (NEPSTAD et al., 2018; SU et al., 2018b; TABE et al., 2017), para adaptação de protocolos quimioterápicos, sobretudo para pacientes de risco aumentado (NEPSTAD et al., 2018). Linsitinibe foi capaz de inibir os efetores das vias MAPK e PI3K/Akt/mTOR nas linhagens celulares testadas NB4, NB4-R2 e Kasumi-1 e apresentou efeitos citotóxicos moderados em concentrações mais baixas. A inibição farmacológica de IGF1R induziu autofagia nas linhagens celulares, provavelmente em decorrência da inibição de mTOR, reconhecidamente um potente regulador da autofagia (DUNLOP; TEE, 2014; JUNG et al., 2010; SCHMEISSER; PARKER, 2019). A autofagia compreende um mecanismo celular catabólico relacionado a reciclagem de proteínas e organelas para obtenção de substratos para manutenção do metabolismo basal (LEVINE; KROEMER, 2008). Sob o ponto de vista da fisiopatologia das neoplasias, a autofagia pode ser interpretada como mecanismo promotor ou supressor tumoral (MULCAHY LEVY; THORBURN, 2020; SINGH et al., 2018). No contexto avaliado no presente projeto, a autofagia pode ocorrer como mecanismo limitante da eficiência terapêutica, uma vez que a inibição da autofagia combinada a de IGF1R apresentou efeito superior às monoterapias. O linsitinibe foi testado em diversos contextos de estudos clínicos, e falhou em demonstrar superioridade terapêutica em vasta maioria dos ensaios (VON MEHREN et al., 2020). Será importante avaliar se a indução de autofagia mediada pelo linsitinibe é consistente em outros contextos celulares e moleculares e se a inibição combinada da autofagia poderá ressignificar o uso desse composto.

Aprofundando os resultados clínicos e funcionais que obtivemos da participação de IGF1R em LMA, realizamos a análise de enriquecimento de conjuntos gênicos com o propósito de elucidar processos biológicos desconhecidos relacionados a expressão de *IGF1R* e *IGF2R*. A função como supressor tumoral de IGF2R (ALEKSIC et al., 2010b; LAUTEM et al., 2019; TAKEDA et al., 2019), ainda hipotética devido à escassez de estudos funcionais que avaliaram sua função no contexto neoplásico, foi reforçada pela alta frequência de processos

simultaneamente positivamente enriquecidos com expressão *IGF2R* e negativamente enriquecidos com a expressão de *IGF1R*. A expressão gênica de *IGF2* e *IGF2R* é regulada por processos epigenéticos, tais como *imprinting* (LATHAM et al., 1994; MARCHO et al., 2015; WUTZ et al., 1997). Os dados obtidos pelo desenvolvimento do presente projeto não determinaram os mecanismos envolvidos no controle da expressão de *IGF2R* ou os mecanismos por ele regulados. Esses dados lançaram luz sobre o significado do impacto clínico de *IGF2R* em LMA.

A alta expressão de *IRS1* identificou pacientes com risco favorável em LMA. De maneira controversa, a expressão aumentada de *IRS1* foi associada previamente a prognóstico desfavorável em pacientes pediátricos com LLA (JURIC et al., 2007). A expressão gênica de *IRS2* não foi capaz de identificar pacientes com risco diferencial. É bem documentado para tumores sólidos, tais como em pulmão e mama, que *IRS1* e *IRS2* desempenham papéis antagônicos. Enquanto *IRS2* é tido como pro-metastático, *IRS1* parece ser um supressor tumoral (GIBSON; MA; SHAW, 2007; KIM et al., 2018; PIPER et al., 2019).

A inibição farmacológica de *IGF1R-IRS1/2* com NT157, reduziu a viabilidade e induziu apoptose em células primárias de pacientes com LMA e em linhagens celulares. A inibição de vias relacionadas aos mecanismos que conferem vantagem proliferativa as células neoplásicas suporta o conceito de terapia complementar mais eficaz. NT157 foi capaz de inibir importantes eixos de crescimento celular, tais como PI3K/Akt/mTOR e MAPK, similarmente a linsitinibe. Coletivamente, os dados sugerem que a inibição farmacológica de *IGF1R-IRS1/2* é promissora para contornar a ativação autócrina de Akt em blastos leucêmicos de LMA (CHAPUIS et al., 2010; TAMBURINI et al., 2007). Identificamos novos mecanismos de ação da droga NT157, principalmente em dois eixos: 1) investigação da ação do NT157 sobre a função mitocondrial e 2) ativação do mecanismo de resposta a estresse celular AP-1 (SHAULIAN; KARIN, 2002). Inicialmente, o mecanismo de ação do NT157 foi descrito como decorrente de uma alteração conformacional em *IGF1R* responsável por ativar ERK1/2 que então seria responsável por fosforilar *IRS1/2* em resíduos de serina para degradação via proteassomo (REUVENI et al., 2013). Posteriormente, Su e colaboradores (SU et al., 2018a), utilizando fosfoproteoma global identificaram que o tratamento com NT157 é capaz de induzir a ativação de P38 e JNK, reconhecidamente relacionado a fosforilação em resíduos serina e degradação de *IRS1/2* (HERR; DEBATIN, 2001;

LEE et al., 2003). Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que o tratamento com NT157 induz parada do ciclo celular em G2/M e aumenta a expressão de p21, c-Jun e c-Fos, quadro molecular associado a ativação do complexo AP-1 em linhagens celulares de LLA, LMC e NMP JAK2V617F (FENERICH et al., 2020; RODRIGUES ALVES et al., 2019; SCOPIM-RIBEIRO et al., 2021). Com os resultados que produzimos, identificamos a ativação de P38 e JNK em LMA, corroborando esse como sendo um mecanismo de ação da droga independente de ERK1/2. A respeito da função mitocondrial, identificamos que o NT157 aumenta a massa mitocondrial, induz a produção de espécies reativas de oxigênio total e mitocondrial e afeta a capacidade de polarização do potencial de membrana mitocondrial. Coletivamente, esses dados sugerem que a citotoxicidade mediada por NT157 possivelmente induz fissão mitocondrial e como consequência ativa a apoptose através da via intrínseca (LOPEZ; TAIT, 2015; WANG; YOULE, 2009).

Os componentes selecionados da via de IGF1R-IRS1/2, com exceção de IGF2R, tiveram expressão diminuída em pacientes com LMA com mutação em FLT3. Por se tratar de um receptor de fator de crescimento bastante relevante na autorrenovação e diferenciação de progenitores mielóides, o FLT3 pode ser suficiente para transformação e a expressão de outros fatores de crescimento é menos necessária em LMA (GARY GILLILAND; GRIFFIN, 2002; KIKUSHIGE et al., 2008; TSAPOGAS et al., 2017). Entretanto, as necessidades de fatores de crescimento adicionais para a transformação relacionada ao FLT3 mutante permanece ponto de debate. Em virtude de mutações em FLT3 serem identificadas em aproximadamente 25% dos pacientes com LMA (DÖHNER et al., 2017; TCGA, 2013), foram desenvolvidos inibidores seletivos para este alvo. Atualmente, dois compostos são aprovados para os pacientes com mutação em FLT3 (PERL et al., 2019; STONE et al., 2017). Estes inibidores apresentaram melhoria na sobrevida global, mesmo quando administrados após recidiva em protocolos de quimioterapia de resgate. Entretanto, o desenvolvimento de resistência aos inibidores é um problema relevante clinicamente que demanda a identificação de protocolos mais eficazes (TYNER et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

Os inibidores de IGF1R-IRS1/2 linsitinibe e NT157 foram citotóxicos nas linhagens de LMA com mutação em FLT3 de maneira similar as demais testadas. Em combinação com os inibidores de FLT3, a combinação de linsitinibe com midostaurin ou quizartinibe teve efeito aditivo, enquanto o NT157 em monoterapia

apresentou citotoxicidade bastante pronunciada. É teoricamente possível que as proteínas IRS1/2 participem do processo de transdução de sinal mediado por FLT3, amplificando sua sinalização, e em razão disso a combinação de NT157 e FLT3 não possuem significativo incremento em combinação. Por outro lado, a ativação de IGF1R pode desempenhar função relevante no contexto de células com mutação em FLT3 e em razão disso a combinação de inibidores de IGF1R e FLT3 pode ser relevante clinicamente. Digno de nota, os inibidores de FLT3 foram capazes de abolir a ativação de IGF1R, enquanto o NT157 foi capaz de inibir a ativação de FLT3, sugerindo que as vias podem estar conectadas nesse contexto celular. Outra possível explicação seria a identificação de ação em outros alvos (*off-target*), fato bem demonstrado para midostaurin (WANDER; FATHI; LEVIS, 2014; WEIS et al., 2019). Comparados diretamente, identificamos que o linsitinibe induz autofagia e o NT157 ativa o complexo AP-1, como mecanismos particulares de cada composto. Foi realizado um ensaio de proteômica com o objetivo de identificar processos celulares e moleculares especificamente relacionados a cada composto e, quando finalizada, esta análise lançará luz sobre novos processos e oportunidades terapêuticas.

5. CONCLUSÕES

- Confirmamos o benefício clínico da metformina na redução da esplenomegalia em modelo murino de NMP, e demonstramos que seus efeitos não foram capazes de afetar a frequência dos progenitores hematopoiéticos na NMP Jak2V617F;

- Modelamos um índice prognóstico baseado em assinatura transcriptômica para pacientes com SMD com capacidade preditiva para sobrevida global superior ao índice IPSS-R amplamente utilizados na prática clínica.

- A alta razão de expressão gênica de *IGF1R/IGF2R* é capaz de distinguir pacientes com LMA e LPA com prognóstico desfavorável;

- A baixa expressão de *IRS1* identifica pacientes com LMA com sobrevida global e sobrevida livre de doença inferiores;

- A alta expressão de *IGF1R* e baixa expressão de *IRS1* prediz sobrevida livre de doença inferior em pacientes com LMA associadas a mutação em FLT3;

- Os inibidores de IGF1R/IR, linsitinibe, e de IGF1R/IRS1-2, NT157, são citotóxicos em modelos celulares de LMA, mas possuem efeitos celulares distintos. Linsitinibe induz autofagia como mecanismo limitante de sua eficiência, enquanto NT157 é citotóxico através da indução da apoptose, afeta a função mitocondrial e ativa vias de estresse celular.

6. Referências

ABDEL-WAHAB, O.; LEVINE, R. L. **Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia** *Blood* American Society of Hematology, , 2 maio 2013.

AIKEN, R. et al. Phase I clinical trial of AXL1717 for treatment of relapsed malignant astrocytomas: Analysis of dose and response. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81501–81510, 2017.

AL-SAAD, S. et al. The impact of MET, IGF-1, IGF1R expression and EGFR mutations on survival of patients with non-small-cell lung cancer. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–20, 2017.

ALEKSIC, T. et al. Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 16, p. 6412–6419, 15 ago. 2010a.

ALEKSIC, T. et al. Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. **Cancer research**, v. 70, n. 16, p. 6412–9, 15 ago. 2010b.

ALEKSIC, T. et al. IGF-1R associates with adverse outcomes after radical radiotherapy for prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 11, p. 1600–1606, 21 nov. 2017.

ALEKSIC, T. et al. Nuclear IGF1R interacts with regulatory regions of chromatin to promote RNA polymerase II recruitment and gene expression associated with advanced tumor stage. **Cancer Research**, v. 78, n. 13, p. 3497–3509, 1 jul. 2018.

ALGIRE, C. et al. Diet and tumor LKB1 expression interact to determine sensitivity to anti-neoplastic effects of metformin in vivo. **Oncogene**, v. 30, n. 10, p. 1174–1182, 10 mar. 2011.

ALHAN, C. et al. The myelodysplastic syndromes flow cytometric score: a three-parameter prognostic flow cytometric scoring system. **Leukemia**, v. 30, n. 3, p. 658–665, 27 mar. 2016.

ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186–190, nov. 1994.

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. 2391–2406, 2016.

ARRIETA, O. et al. Effect of Metformin Plus Tyrosine Kinase Inhibitors Compared with Tyrosine Kinase Inhibitors Alone in Patients with Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Lung Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncology**, v. 5, n. 11, p. 1925–1933, 1 nov. 2019.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. **Drug repositioning: Identifying and**

developing new uses for existing drugs *Nature Reviews Drug Discovery* Nature Publishing Group, , 2004.

ASLAM, M. I. et al. Dynamic and nuclear expression of PDGFR α and IGF-1R in alveolar rhabdomyosarcoma. **Molecular Cancer Research**, v. 11, n. 11, p. 1303–1313, nov. 2013.

ASMANE, I. et al. Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) exclusive nuclear staining: A predictive biomarker for IGF-1R monoclonal antibody (Ab) therapy in sarcomas. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 16, p. 3027–3035, nov. 2012.

BARATA, P. et al. A phase 2 study of OSI-906 (linsitinib, an insulin-like growth factor receptor-1 inhibitor) in patients with asymptomatic or mildly symptomatic (non-opioid requiring) metastatic castrate resistant prostate cancer (CRPC). **Investigational New Drugs**, v. 36, n. 3, p. 451–457, 1 jun. 2018.

BARBUI, T. et al. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. **Blood Cancer Journal**, v. 5, n. 8, p. e337-8, 2015.

BARBUI, T. et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. **Leukemia**, v. 32, n. 5, p. 1057–1069, 27 maio 2018.

BARTHEL, A. et al. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20281–20286, 16 jul. 1999.

BAUER, D. E. et al. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. **Oncogene**, v. 24, n. 41, p. 6314–6322, 15 set. 2005.

BAUMANN, C. A. et al. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 202–207, 14 set. 2000.

BAXTER, E. J. et al. Mechanisms of Disease Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, p. 1054–1061, 2005.

BECKER, M. A. et al. Insulin receptor substrate adaptor proteins mediate prognostic gene expression profiles in breast cancer. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–12, 2016.

BEJAR, R. et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 26, p. 2496–2506, 2011.

BEJAR, R. et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 27, p. 3376–3382, 20 set. 2012.

BEJAR, R. et al. Somatic Mutations Predict Poor Outcome in Patients With Myelodysplastic Syndrome After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. **Journal of**

Clinical Oncology, v. 32, n. 25, p. 1–9, 2014.

BEJAR, R.; LEVINE, R.; EBERT, B. L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 504–15, 10 fev. 2011.

BENDELL, J. C. et al. A phase Ib study of linsitinib (OSI-906), a dual inhibitor of IGF-1R and IR tyrosine kinase, in combination with everolimus as treatment for patients with refractory metastatic colorectal cancer. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 1, p. 187–193, 2015.

BENICIO, M. T. DE L. et al. Evaluation of the European LeukemiaNet recommendations for predicting outcomes of patients with acute myeloid leukemia treated in low- and middle-income countries (LMIC): A Brazilian experience. **Leukemia Research**, v. 60, p. 109–114, 1 set. 2017.

BERGMAN, D. et al. Insulin-Like Growth Factor 2 in Development and Disease: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 59, n. 3, p. 240–249, 2013.

BERNARD, E. et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1549–1556, 1 out. 2020.

BERWICK, D. C. et al. The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 33895–33900, 13 set. 2002.

BIRNBAUM, M. J. Turning down insulin signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 5, p. 655–659, 1 set. 2001.

BIRSOY, K. et al. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 540–551, 1 ago. 2015.

BIRSOY, K.; SABATINI, D. M.; POSSEMATO, R. Untuning the tumor metabolic machine: Targeting cancer metabolism: A bedside lesson. **Nature Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1022–1023, 6 jul. 2012.

BRAVO, G. M. et al. Integrating genetics and epigenetics in myelodysplastic syndromes: Advances in pathogenesis and disease evolution. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 5, p. 646–659, 2014.

BRIAN DALTON, W. et al. Hotspot SF3B1 mutations induce metabolic reprogramming and vulnerability to serine deprivation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 11, p. 4708–4723, 1 nov. 2019.

BROWN, J. R. et al. Phase II clinical trial of metformin as a cancer stem cell-targeting agent in ovarian cancer. **JCI Insight**, v. 5, n. 11, 4 jun. 2020.

BUZZAI, M. et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin

selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. **Cancer Research**, v. 67, n. 14, p. 6745–6752, 15 jul. 2007.

CAMPOS, P. D. M. et al. IRS2 silencing increases apoptosis and potentiates the effects of ruxolitinib in JAK2 V617F -positive myeloproliferative neoplasms. **Oncotarget**, v. 7, n. 6, 2016.

CAMPOS, P. D. M. et al. Analysis of Metformin Effects on Bone Marrow Fibrosis and Disease Progression in Primary Myelofibrosis Patients: Preliminary Results of an Open Label Phase II Trial (FIBROMET). **Blood**, v. 134, n. Supplement_1, p. 554–554, 13 nov. 2019.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 22, p. 2059–2074, 30 maio 2013.

CAVAGLIERI, R. C. et al. Metformin prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 412, p. 116–122, 5 set. 2015.

CAVALLI, L. R.; VARELLA-GARCIA, M.; LIANG, B. C. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. **Cell Growth and Differentiation**, v. 8, n. 11, p. 1189–1198, nov. 1997.

CERAMI, E. et al. In Focus The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. **Cancer Discovery**, v. 2, n. May, p. 401–404, 2012.

CERVANTES, F. et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 2895–2901, 2009.

CHALLEN, G. A. et al. **Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis** **Cytometry Part A** Cytometry A, , jan. 2009.

CHAN, S. M. et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. **Nature Medicine**, v. 21, n. 2, p. 178–184, 19 jan. 2015.

CHANDEL, N. S. **Mitochondria as signaling organelles** **BMC Biology** BioMed Central Ltd., , 27 maio 2014.

CHANETON, B. et al. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 458–462, 15 nov. 2012.

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. 415–423, 2010.

CHEN, E.; MULLALLY, A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? **Hematology / the Education Program of the**

American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, n. 2, p. 268–276, 2011.

CHEN, W. L. et al. A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. **Blood**, v. 124, n. 10, p. 1645–1654, 4 set. 2014.

CHIAPPORI, A. A. et al. A Randomized Phase II Study of Linsitinib (OSI-906) Versus Topotecan in Patients With Relapsed Small-Cell Lung Cancer. **The Oncologist**, v. 21, n. 10, p. 1163, out. 2016.

CHIEVITZ, E.; THIEDE, T. Complications and Causes of Death in Polycythaemia Vera. **Acta Medica Scandinavica**, v. 172, n. 5, p. 513–523, 24 abr. 2009.

CHRISTOFK, H. R. et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 230–233, 13 mar. 2008.

CIBODDO, M.; MULLALLY, A. JAK2 (and other genes) be nimble with MPN diagnosis, prognosis, and therapy. **Hematology**, v. 2018, n. 1, p. 110–117, 30 nov. 2018.

COELHO-SILVA, J. L. et al. Molecular-Based Score inspired on metabolic signature improves prognostic stratification for myelodysplastic syndrome. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

CORSELLO, S. M. et al. Discovering the anticancer potential of non-oncology drugs by systematic viability profiling. **Nature Cancer**, v. 1, n. 2, p. 235–248, 20 fev. 2020.

CRAPARO, A.; FREUND, R.; GUSTAFSON, T. A. 14-3-3 (ϵ) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 17, p. 11663–11669, 25 abr. 1997.

CREIGHTON, C. J. et al. Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancer prognosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 25, p. 4078–4085, 2008.

DALE, O. T. et al. IGF-1R expression is associated with HPV-negative status and adverse survival in head and neck squamous cell cancer. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 6, p. 648–655, 1 jun. 2015.

DAVER, N. et al. Impact of comorbidities by ACE-27 in the revised-IPSS for patients with myelodysplastic syndromes. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 5, p. 509–516, 2014.

DE ALMEIDA, M. J. et al. Dye-Independent Methods Reveal Elevated Mitochondrial Mass in Hematopoietic Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 21, n. 6, p. 725–729.e4, 7 dez. 2017.

DE FEA, K.; ROTH, R. A. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31400–31406, 12 dez. 1997.

DE JONGE, H. J. M. et al. High VEGFC expression is associated with unique gene expression profiles and predicts adverse prognosis in pediatric and adult acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 116, n. 10, p. 1747–1754, 9 set. 2010.

DE MEYTS, P.; SHYMKO, R. M. Timing-dependent modulation of insulin mitogenic versus metabolic signalling. **Novartis Foundation Symposium**, v. 227, p. 46–60, 2000.

DEBERARDINIS, R. J. et al. **The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation** Cell Metabolism Cell Press, , 9 jan. 2008.

DEININGER, M. et al. The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. **Blood**, v. 126, n. 13, p. 1551–4, 24 set. 2015.

DELONG, E. R.; DELONG, D. M.; CLARKE-PEARSON, D. L. Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach. **Biometrics**, v. 44, n. 3, p. 837, set. 1988.

DENG, H. et al. Over-accumulation of nuclear IGF-1 receptor in tumor cells requires elevated expression of the receptor and the SUMO-conjugating enzyme Ubc9. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, n. 2, p. 667–671, 14 jan. 2011.

DINARDO, C. D.; CORTES, J. E. **New treatment for acute myelogenous leukemia** Expert Opinion on Pharmacotherapy Informa Healthcare, , 1 jan. 2015.

DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood**, v. 129, n. 4, p. 424–447, 26 jan. 2017.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136–1152, 17 set. 2015.

DOMBRET, H.; GARDIN, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 127, n. 1, p. 53–61, 7 jan. 2016.

DOWLING, R. J. O. et al. **Metformin in cancer: Translational challenges** Journal of Molecular Endocrinology J Mol Endocrinol, , jun. 2012.

DRUKER, B. J. et al. Effects of a selective inhibitor of the Ab1 tyrosine kinase on the growth of Bcr-Ab1 positive cells. **Nature Medicine**, v. 2, n. 5, p. 561–566, 1996.

DUNLOP, E. A.; TEE, A. R. **MTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy** Seminars in Cell and Developmental

Biology Academic Press, , 1 dez. 2014.

EL-MIR, M. Y. et al. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 223–228, 7 jan. 2000.

ELF, S. et al. Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. **Cancer Discovery**, 2016.

ELF, S. et al. Defining the requirements for the pathogenic interaction between mutant calreticulin and MPL in MPN. **Blood**, v. 131, n. 7, p. 782–786, 15 fev. 2018.

EMADI, A. et al. Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. **Experimental Hematology**, v. 42, n. 4, p. 247–251, 1 abr. 2014.

EPPERT, K. et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. **Nature Medicine**, v. 17, n. 9, p. 1086–1094, set. 2011.

ESTEY, E. Acute Myeloid Leukemia — Many Diseases, Many Treatments. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 21, p. 2094–2095, 24 nov. 2016.

EVANS, J. M. M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ**, v. 330, n. 7503, p. 1304–1305, 4 jun. 2005.

FAGUNDES, E. M. et al. De novo acute myeloid leukemia in adults younger than 60 years of age: Socioeconomic aspects and treatment results in a Brazilian university center. **Leukemia and Lymphoma**, v. 47, n. 8, p. 1557–1564, ago. 2006.

FARABAUGH, S. M.; BOONE, D. N.; LEE, A. V. **Role of IGF1R in breast cancer subtypes, stemness, and lineage differentiation** *Frontiers in Endocrinology* Frontiers Media S.A., , 2015.

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. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 4, p. 426–435, 2015.

FENERICH, B. A. et al. NT157 has antineoplastic effects and inhibits IRS1/2 and STAT3/5 in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasm cells. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 1 dez. 2020.

FERNANDES, J. C. et al. IRS1/ β -Catenin Axis Is Activated and Induces MYC Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 7, p. 1774–1781, jul. 2017.

FIGUEROA, M. E. et al. Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. **Cancer Cell**, v. 18, n. 6, p. 553–567, 14 dez. 2010.

FLEISCHMAN, A. G. et al. TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 24, p. 6392–6398, 8

dez. 2011.

FUCIKOVA, J. et al. **Calreticulin and cancer** *Cell Research* Springer Nature, , 1 jan. 2021.

GARCIA-MANERO, G.; CHIEN, K. S.; MONTALBAN-BRAVO, G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 11, p. 1399–1420, 17 nov. 2020.

GARY GILLILAND, D.; GRIFFIN, J. D. **The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia** *Blood*, , 1 set. 2002.

GASIOROWSKI, R. E. et al. **Antibody therapy for acute myeloid leukaemia** *British Journal of Haematology* Br J Haematol, , fev. 2014.

GERSTUNG, M. et al. Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in Myelodysplastic Syndromes. **Nature communications**, p. 1–11, 2015.

GEYER, H. L. et al. Distinct clustering of symptomatic burden among myeloproliferative neoplasm patients: Retrospective assessment in 1470 patients. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3803–3810, 2014.

GIBSON, S. L.; MA, Z.; SHAW, L. M. Divergent roles for IRS-1 and IRS-2 in breast cancer metastasis. **Cell Cycle**, v. 6, n. 6, p. 631–637, 2007.

GOODWIN, P. J. et al. Effect of Metformin vs Placebo on and Metabolic Factors in NCIC CTG MA.32. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 3, p. djv006–djv006, 4 mar. 2015.

GOTTLOB, K. et al. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. **Genes and Development**, v. 15, n. 11, p. 1406–1418, 1 jun. 2001.

GREEN, A. S. et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4262–4273, 18 nov. 2010.

GREENBERG, P. L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454–65, 20 set. 2012.

GUGLIELMELLI, P. et al. MIPSS70: Mutation-enhanced international prognostic score system for transplantation-age patients with primary myelofibrosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 4, p. 310–318, 1 fev. 2018.

GUSTAFSON, T. A. et al. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 5, p. 2500–2508, maio 1995.

HAASE, D. et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with

complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. **Leukemia**, v. 33, n. 7, p. 1747–1758, 1 jul. 2019.

HAFERLACH, T. et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 241–247, fev. 2014.

HALUSKA, P. et al. Phase I dose-escalation study of MEDI-573, a bispecific, antiligand monoclonal antibody against IGFI and IGFII, in patients with advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 18, p. 4747–4757, 15 set. 2014.

HARRISON, C. Rethinking disease definitions and therapeutic strategies in essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2010, p. 129–134, 2010.

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. 1701–1707, 2016.

HAUBNER, S. et al. Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. **Leukemia 2018**, v. 33, n. 1, p. 64–74, 26 jun. 2018.

HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. **Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation** ScienceScience, , 22 maio 2009.

HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2603–14, nov. 2001.

HIROSUMI, J. et al. A central, role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333–336, 21 nov. 2002.

HIRSCH, H. A. et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. **Cancer Research**, v. 69, n. 19, p. 7507–7511, 1 out. 2009.

HOCHHAUS, A. et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 10, p. 917–927, 9 mar. 2017.

HUA, H. et al. **Targeting mTOR for cancer therapy** Journal of Hematology and OncologyBioMed Central Ltd., , 5 jul. 2019.

IAMS, W. T.; LOVLY, C. M. Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direction of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Pathway Blockade. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 19, p. 4270–4277, 1 out. 2015.

IBUKI, N. et al. The Tyrphostin NT157 Suppresses Insulin Receptor Substrates and Augments Therapeutic Response of Prostate Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 12, p. 2827–2839, dez. 2014.

IGUCHI, H. et al. Phase I dose-escalation study evaluating safety, tolerability and pharmacokinetics of MEDI-573, a dual IGF-I/II neutralizing antibody, in Japanese patients with advanced solid tumours. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 1, p. 194–200, 2015.

INRA, C. N. et al. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. **Nature**, v. 527, n. 7579, p. 466–471, 26 nov. 2015.

IRIZARRY, R. A. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics (Oxford, England)**, v. 4, n. 2, p. 249–264, 2003.

JAATINEN, T. et al. Global Gene Expression Profile of Human Cord Blood-Derived CD133 + Cells . **Stem Cells**, v. 24, n. 3, p. 631–641, mar. 2006.

JANZER, A. et al. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 29, p. 10574–10579, 22 jul. 2014.

JOHNSTON, J. A. et al. Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 48, p. 28527–28530, 1995.

JUNG, C. H. et al. **MTOR regulation of autophagy** *FEBS Letters* Elsevier, , 2010.

JURIC, D. et al. Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 11, p. 1341–9, 10 abr. 2007.

KANTARJIAN, H. et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: Predictive prognostic models for outcome. **Cancer**, v. 106, n. 5, p. 1090–1098, 1 mar. 2006.

KAWASHIMA, I.; KIRITO, K. Metformin inhibits JAK2V617F activity in MPN cells by activating AMPK and PP2A complexes containing the B56 α subunit. **Experimental Hematology**, v. 44, n. 12, p. 1156- 1165.e4, 1 dez. 2016.

KHATIB, A. M. et al. Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: Importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30686–30693, 17 ago. 2001.

KHOURY, H. J. et al. Ruxolitinib: A steroid sparing agent in chronic graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplantation**, v. 53, n. 7, p. 826–831, 1 jul. 2018.

KIKUSHIGE, Y. et al. Human Flt3 Is Expressed at the Hematopoietic Stem Cell and the Granulocyte/Macrophage Progenitor Stages to Maintain Cell Survival. **The**

Journal of Immunology, v. 180, n. 11, p. 7358–7367, 1 jun. 2008.

KILADJIAN, J. J. et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. **Blood**, v. 112, n. 8, p. 3065–3072, 15 out. 2008.

KIM, H. et al. The expression of insulin receptor substrate 1 and estrogen receptor as prognostic factor on breast cancer patient. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 14, n. 9, p. 494, 2018.

KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 25, p. 2379–90, 2013.

KRALOVICS, R. et al. A Gain-of-Function Mutation of Mutation of JAK2 in Myeloproliferatives Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, p. 1779–1790, 2005.

KRONSTEIN-WIEDEMANN, R.; TONN, T. Colony Formation: An Assay of Hematopoietic Progenitor Cells. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2019. v. 2017p. 29–40.

KRUG, U. et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: A web-based application for prediction of outcomes. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2000–2008, 11 dez. 2010.

KURTZ, A. et al. Insulin-like growth factor I stimulates erythropoiesis in hypophysectomized rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 20, p. 7825–9, out. 1988.

LAGADINO, E. D. et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 3, p. 329–341, 7 mar. 2013.

LATAILLADE, J. J. et al. **Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence****Blood**American Society of Hematology, , 15 out. 2008.

LATHAM, K. E. et al. Igf2r and Igf2 gene expression in androgenetic, gynogenetic, and parthenogenetic preimplantation mouse embryos: Absence of regulation by genomic imprinting. **Genes and Development**, v. 8, n. 3, p. 290–299, 1994.

LAUTEM, A. et al. Expression and prognostic significance of insulin-like growth factor-2 receptor in human hepatocellular carcinoma and the influence of transarterial chemoembolization. **Oncology Reports**, v. 41, n. 4, p. 2299–2310, 1 abr. 2019.

LAVAN, B. E.; LANE, W. S.; LIENHARD, G. E. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 17, p. 11439–11443, 25 abr. 1997.

LAW, J. H. et al. Phosphorylated insulin-like growth factor-I/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival. **Cancer Research**, v. 68, n. 24, p. 10238–10246, 15 dez. 2008.

LE BOUSSE-KERDILÈS, M. C.; MARTYRÉ, M. C. **Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis** *Annals of Hematology* Ann Hematol, , out. 1999.

LEBLEU, V. S. et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 10, p. 992–1003, 1 out. 2014.

LECHLEIDER, R. J.; FREEMAN, R. M.; NEEL, B. G. Tyrosyl phosphorylation and growth factor receptor association of the human corkscrew homologue, SH-PTP2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 18, p. 13434–13438, 25 jun. 1993.

LEE, J. H. et al. Tescalcin/c-Src/IGF1R β -mediated STAT3 activation enhances cancer stemness and radioresistant properties through ALDH1. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10711, 1 dez. 2018.

LEE, Y. H. et al. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 2896–2902, 31 jan. 2003.

LEHR, S. et al. Identification of major tyrosine phosphorylation sites in the human insulin receptor substrate Gab-1 by insulin receptor kinase in vitro. **Biochemistry**, v. 39, n. 35, p. 10898–10907, 5 set. 2000.

LEROITH, D. et al. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 2, p. 143–163, 1995.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, 2008.

LEVINE, R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 387–397, 2005.

LI, J.; DEFEA, K.; ROTH, R. A. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 14, p. 9351–9356, 2 abr. 1999.

LIU, D.; RUTTER, W. J.; WANG, L. H. Modulating effects of the extracellular sequence of the human insulinlike growth factor I receptor on its transforming and tumorigenic potential. **Journal of Virology**, v. 67, n. 1, p. 9–18, 1993.

LIU, J. et al. APS Facilitates c-Cbl Tyrosine Phosphorylation and GLUT4 Translocation in Response to Insulin in 3T3-L1 Adipocytes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 11, p. 3599–3609, 1 jun. 2002.

LIU, J. et al. The roles of Cbl-b and c-Cbl in insulin-stimulated glucose transport. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36754–36762, 19 set. 2003.

LIU, S. B. et al. Loss of IGF2R indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation and tumorigenesis in bladder cancer via AKT signaling pathway. **Neoplasma**, v. 67, n. 1, p. 129–136, 2020.

LIU, X. et al. Metformin Targets Central Carbon Metabolism and Reveals Mitochondrial Requirements in Human Cancers. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 5, p. 728–739, 8 nov. 2016.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. **Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within** **British Journal of Cancer** Nature Publishing Group, , 17 mar. 2015.

LORD, S. R. et al. Integrated Pharmacodynamic Analysis Identifies Two Metabolic Adaption Pathways to Metformin in Breast Cancer. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 679- 688.e4, 6 nov. 2018.

LUNT, S. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 441–464, 2011.

MACHADO-NETO, J. A. et al. Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 8, p. 1404–1411, 2011.

MACHADO-NETO, J. A. et al. Downregulation of IRS2 in myelodysplastic syndrome: A possible role in impaired hematopoietic cell differentiation. **Leukemia Research**, v. 36, n. 7, p. 931–935, 2012.

MACHADO-NETO, J. A. et al. Metformin exerts multitarget antileukemia activity in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 3, p. 311, 22 mar. 2018.

MALCOVATI, L. et al. SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: A proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. **Blood**, v. 136, n. 2, p. 157–170, 9 jul. 2020.

MARCHIOLI, R. et al. Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 1, p. 22–33, 3 jan. 2013.

MARCHO, C. et al. Tissue-specific regulation of Igf2r/Airn imprinting during gastrulation. **Epigenetics and Chromatin**, v. 8, n. 1, p. 10, 1 dez. 2015.

MARCUS, M. W.; FIELD, J. K. **Is bootstrapping sufficient for validating a risk model for selection of participants for a lung cancer screening program?** **Journal of Clinical Oncology** American Society of Clinical Oncology, , 10 mar. 2017.

MARIS, C. et al. IGF-IR: A new prognostic biomarker for human glioblastoma. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 5, p. 729–737, 1 set. 2015.

MARTINEZ, C. A.; SCAFOGLIO, C. **Heterogeneity of glucose transport in lung cancer***Biomolecules*MDPI AG, , 1 jun. 2020.

MEAD, A. J.; MULLALLY, A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. **Blood**, v. 129, n. 12, p. 1607–1616, 23 mar. 2017.

MEMMOTT, R. M. et al. Metformin prevents tobacco carcinogen-induced lung tumorigenesis. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 9, p. 1066–1076, set. 2010.

MERCHAV, S.; LAKE, M.; SKOTTNER, A. Comparative studies of the granulopoietic enhancing effects of biosynthetic human insulin-like growth factors I and II. **Journal of cellular physiology**, v. 157, n. 1, p. 178–83, out. 1993.

MICHALAK, M. et al. **Calreticulin***Biochemical Journal*Biochem J, , 1992.

MICHIELS, J. J. et al. Platelet-mediated erythromelalgic, cerebral, ocular and coronary microvascular ischemic and thrombotic manifestations in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera: A distinct aspirin-responsive and coumadin-resistant arterial thrombophilia. **Platelets**, v. 17, n. 8, p. 528–544, 1 dez. 2006.

MIYAKAWA, Y. et al. Thrombopoietin Induces Phosphoinositol 3-Kinase Activation through SHP2, Gab, and Insulin Receptor Substrate Proteins in BAF3 Cells and Primary Murine Megakaryocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2494–2502, jan. 2001.

MOLICA, M.; MASSARO, F.; BRECCIA, M. Diagnostic and prognostic cytogenetics of chronic myeloid leukaemia: an update. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 11, p. 1001–1008, 2 nov. 2017.

MOOTHA, V. K. et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics**, v. 34, n. 3, p. 267–273, 1 jul. 2003.

MORAIS, R. et al. Tumor-forming Ability in Athymic Nude Mice of Human Cell Lines Devoid of Mitochondrial DNA. **Cancer Research**, v. 54, n. 14, p. 3889–3896, 15 jul. 1994.

MOSSUZ, P. et al. **Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis***haematologica*. [s.l: s.n.].

MULCAHY LEVY, J. M.; THORBURN, A. **Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients***Cell Death and Differentiation*Springer Nature, , 1 mar. 2020.

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. 584–596, 2010.

MULLER, D. C.; JOHANSSON, M.; BRENNAN, P. Lung cancer risk prediction model incorporating lung function: Development and validation in the UK biobank prospective cohort study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 8, p. 861–869, 10 mar. 2017.

MURAKAMI, T. et al. Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 13, p. 9300–9306, 5 maio 1992.

MYERS, M. G.; WHITE, M. F. **New frontiers in insulin receptor substrate signaling** *Trends in Endocrinology and Metabolism* *Trends Endocrinol Metab*, , 1995.

NANGALIA, J. et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 25, p. 2391–2405, dez. 2013.

NAZHA, A. et al. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 30, n. 11, p. 2214–2220, 1 nov. 2016.

NEPSTAD, I. et al. Resistance to the Antiproliferative In Vitro Effect of PI3K-Akt-mTOR Inhibition in Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells Is Associated with Altered Cell Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 382, 27 jan. 2018.

NG, S. W. K. et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 433–437, 7 dez. 2016.

NOGUCHI, T.; INOUE, H.; TANAKA, T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing - PubMed. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 29, p. 13807–13812, out. 1986.

NOMDEDÉU, J. F. et al. Feasibility of the AML profiler (Skyline™ Array) for patient risk stratification in a multicentre trial: a preliminary comparison with the conventional approach. **Hematological Oncology**, v. 35, n. 4, p. 778–788, 1 dez. 2017.

OWEN, M. R.; DORAN, E.; HALESTRAP, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **Biochemical Journal**, v. 348, n. 3, p. 607–614, 15 jun. 2000.

PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616–3627, 21 nov. 2013.

PARDANANI, A. D. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3472–3476, 2006.

PARDEE, T. S. et al. A phase i study of cpi-613 in combination with high-dose

cytarabine and mitoxantrone for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 9, p. 2060–2073, 1 maio 2018.

PASQUIER, F. et al. Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. **Clinical lymphoma, myeloma & leukemia**, v. 14 Suppl, p. S23-35, set. 2014.

PASSAMONTI, F. et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization - Defined essential thrombocythemia at diagnosis: A study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1197–1201, 9 ago. 2012.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 12 jan. 2016.

PEIRÓ, G. et al. Increased insulin-like growth factor-1 receptor mRNA expression predicts poor survival in immunophenotypes of early breast carcinoma. **Modern Pathology**, v. 24, n. 2, p. 201–208, fev. 2011.

PERL, A. E. et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory *FLT3* -Mutated AML. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 18, p. 1728–1740, 31 out. 2019.

PIKMAN, Y. et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e270, 18 jul. 2006.

PIPER, A. J. et al. Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) and IRS-2 expression levels are associated with prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 1 ago. 2019.

PLAS, D. R. et al. Akt and Bcl-xL Promote Growth Factor-independent Survival through Distinct Effects on Mitochondrial Physiology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 15, p. 12041–12048, 13 abr. 2001.

PLATZBECKER, U. Treatment of MDS. **Blood**, v. 133, n. 10, p. 1096–1107, 7 mar. 2019.

POLLAK, M. **The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: An update** Nature Reviews Cancer Nature Publishing Group, , 16 mar. 2012.

PRADA-ARISMENDY, J.; ARROYAVE, J.; RÖTHLISBERGER, J. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. **Blood reviews**, v. 31, n. 1, 2017.

PUSHPAKOM, S. et al. **Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations** Nature Reviews Drug Discovery Nature Publishing Group, , 28 dez. 2018.

QIN, X. et al. Low shear stress induces ERK nuclear localization and YAP activation to control the proliferation of breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 510, n. 2, p. 219–223, 5 mar. 2019.

QUINTÁS-CARDAMA, A. et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 32, p. 5418–5424, 10 nov. 2009.

RAMALINGAM, S. S. et al. Randomized phase II study of erlotinib in combination with placebo or R1507, a monoclonal antibody to insulin-like growth factor-1 receptor, for advanced-stage non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 34, p. 4574–4580, 1 dez. 2011.

RANGARAJAN, S. et al. Metformin reverses established lung fibrosis in a bleomycin model. **Nature Medicine**, v. 24, n. 8, p. 1121–1127, 2 ago. 2018.

RATHMELL, J. C. et al. Akt-Directed Glucose Metabolism Can Prevent Bax Conformation Change and Promote Growth Factor-Independent Survival. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 20, p. 7315–7328, 15 out. 2003.

REGO, E. M. et al. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 1935–1943, 14 mar. 2013.

REUVENI, H. et al. Therapeutic Destruction of Insulin Receptor Substrates for Cancer Treatment. 2013.

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 Letters**, v. 456, p. 59–68, 1 ago. 2019.

ROSNER, M.; HENGSTSCHLÄGER, M. Targeting Epigenetic Readers in Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 18, p. 1764–1765, nov. 2012.

RUMI, E. et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 7, p. 1062–1069, 14 ago. 2014.

SAITO, Y. et al. AMPK Protects Leukemia-Initiating Cells in Myeloid Leukemias from Metabolic Stress in the Bone Marrow. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 5, p. 585–596, 5 nov. 2015.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism** *Nature*, , 13 dez. 2001.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. **Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links** *Cell*, , 2 mar. 2012.

SANCHEZ-LOPEZ, E. et al. Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 Receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling HHS Public Access. **Oncogene**. **May**, v. 1920, n. 35, p. 2634–2644, 2016.

SANCHO, P.; BARNEDA, D.; HEESCHEN, C. **Hallmarks of cancer stem cell metabolism** *British Journal of Cancer* *Nature Publishing Group*, , 14 jun. 2016.

SANZ, M. A et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. **Blood**, v. 96, n. 4, p. 1247–1253, 2000.

SARFSTEIN, R. et al. Insulin-like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 4, p. 2766–2776, 20 jan. 2012.

SCHACHER, D. H. et al. Developmental expression of insulin receptor substrate-2 during dimethylsulfoxide-induced differentiation of human HL-60 cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 1, p. 113–20, jan. 2000.

SCHMEISSER, K.; PARKER, J. A. Pleiotropic effects of mTOR and autophagy during development and aging. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. SEP, p. 192, 11 set. 2019.

SCLAFANI, F. et al. A randomized phase II/III study of dalotuzumab in combination with cetuximab and irinotecan in chemorefractory, KRAS wild-type, metastatic colorectal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 12, 1 dez. 2015.

SCOPIM-RIBEIRO, R. et al. NT157, an IGF1R-IRS1/2 inhibitor, exhibits antineoplastic effects in pre-clinical models of chronic myeloid leukemia. **Investigational New Drugs**, 2021.

SCOTLAND, S. et al. Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. **Leukemia**, v. 27, n. 11, p. 2129–2138, 9 nov. 2013.

SCOTT, L. M. et al. Mechanisms of Disease Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, p. 1054–1061, 2005.

SCOTT, L. M. et al. Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 14, p. 1457–1457, 2007.

SEHAT, B. et al. SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. **Science Signaling**, v. 3, n. 108, 9 fev. 2010.

SEINO, S.; BELL, G. I. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 159, n. 1, p. 312–316, 28 fev. 1989.

SHANKARAI AH, R. C. et al. Metformin prevents liver tumourigenesis by attenuating fibrosis in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 38, n. 45, p. 7035–7045, 7 nov. 2019.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. E131–E136, maio 2002.

SILVA, W. F. D. et al. Real-life Outcomes on Acute Promyelocytic Leukemia in

Brazil – Early Deaths Are Still a Problem. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 19, n. 2, p. e116–e122, 1 fev. 2019.

SILVEIRA, D. R. A. et al. Integrating clinical features with genetic factors enhances survival prediction for adults with acute myeloid leukemia. **Blood Advances**, v. 4, n. 10, p. 2339–2350, 26 maio 2020.

SINGH, S. S. et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 9, p. 1142–1158, 19 mar. 2018.

SLOSTAD, J. et al. **Ruxolitinib as first-line treatment in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: A single patient experience** **American Journal of Hematology** Wiley-Liss Inc., , 1 fev. 2018.

SONG, K. et al. Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 334–342, 1 jul. 2016.

SONG, M. K.; PARK, B. B.; UHM, J. E. **Understanding splenomegaly in myelofibrosis: Association with molecular pathogenesis** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 18 mar. 2018.

SORROR, M. L. et al. Development and Validation of a Novel Acute Myeloid Leukemia-Composite Model to Estimate Risks of Mortality. **JAMA oncology**, v. 3, n. 12, p. 1675–1682, 1 dez. 2017.

SPIVAK, J. L. Myeloproliferative Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 22, p. 2168–2181, jun. 2017.

STEIN, E. M. et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 130, n. 6, p. 722–731, 10 ago. 2017.

STEIN, E. M. et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant- *IDH2* acute myeloid leukemia treated with enasidenib. **Blood**, p. blood-2018-08-869008, 3 dez. 2018.

STEVENS, B. M. et al. Characterization and targeting of malignant stem cells in patients with advanced myelodysplastic syndromes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

STONE, R. M. et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, p. 454–464, 3 ago. 2017.

SU, S.-P. et al. Impact of the Anticancer Drug NT157 on Tyrosine Kinase Signaling Networks. **Molecular cancer therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 931–942, maio 2018a.

SU, Y. et al. Targeting PI3K, mTOR, ERK, and Bcl-2 signaling network shows superior antileukemic activity against AML ex vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 148, p. 13–26, 1 fev. 2018b.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 25 out. 2005.

SULLIVAN, L. B. et al. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 552–563, 1 ago. 2015.

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. 73–76, 1991.

SUN, X. J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 173–177, 14 set. 1995.

SUN, X. J. et al. The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 2, p. 251–262, 1997.

SUTHANTHIRAN, M. et al. Urinary-Cell mRNA Profile and Acute Cellular Rejection in Kidney Allografts. **New England Journal of Medicine**, v. 369, p. 20–31, 2013.

SWERDLOW, S. H. et al. **World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Revised 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017.

TABE, Y. et al. Inhibition of mTOR kinase as a therapeutic target for acute myeloid leukemia. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 7, p. 705–714, 3 jul. 2017.

TAHIMIC, C. G. T. et al. Regulation of ligand and shear stress-induced insulin-like growth factor 1 (IGF1) signaling by the integrin pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 15, p. 8140–8149, 8 abr. 2016.

TAKEDA, T. et al. Upregulation of IGF2R evades lysosomal dysfunction-induced apoptosis of cervical cancer cells via transport of cathepsins. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 12, p. 1–17, 1 dez. 2019.

TAMBURINI, J. et al. Constitutive phosphoinositide 3-kinase / Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 1025–1029, 2007.

TAN, A. S. et al. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 81–94, 6 jan. 2015.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. **Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *Nat Rev Mol Cell Biol*, , fev. 2006.

TANTI, J. F. et al. Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. **Biochemical Journal**, v. 304, n. 1, p. 17–21, 1994.

TCGA. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 22, p. 2059–2074, 2013.

TEFFERI, A. et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: An international study. **Leukemia**, v. 27, n. 9, p. 1874–1881, set. 2013.

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. 2507–2513, 2014.

TEFFERI, A. et al. Gender and survival in essential thrombocythemia: A two-center study of 1,494 patients. **American Journal of Hematology**, v. 92, n. 11, p. 1193–1197, 1 nov. 2017a.

TEFFERI, A. et al. Targeted next-generation sequencing in myelodysplastic syndromes and prognostic interaction between mutations and IPSS-R. **American Journal of Hematology**, v. 92, n. 12, p. 1311–1317, 1 dez. 2017b.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 12, p. 1551–1560, dez. 2018.

TEFFERI, A. et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. **British Journal of Haematology**, v. 189, n. 2, p. 291–302, 1 abr. 2020.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 96, n. 1, p. 145–162, 2 jan. 2021.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 12, p. 1599–1613, 23 dez. 2020.

THOL, F. et al. Prognostic significance of combined MN1, ERG, BAALC, and EVI1 (MEBE) expression in patients with myelodysplastic syndromes. **Annals of Hematology**, v. 91, n. 8, p. 1221–1233, 10 ago. 2012.

THOME, M. P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of cell science**, p. 4622–4632, 2016.

TIAN, Z. et al. IGF2R expression is associated with the chemotherapy response and prognosis of patients with advanced NSCLC. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1578–1588, 17 dez. 2014.

TOMIMOTO, A. et al. Metformin suppresses intestinal polyp growth in ApcMin/+ mice. **Cancer Science**, v. 99, n. 11, p. 2136–2141, 18 nov. 2008.

TRAINA, F. et al. BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells. **FEBS Letters**, v. 535, p. 17–22, 2003.

TSAPOGAS, P. et al. **The cytokine Flt3-ligand in normal and malignant hematopoiesis** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 1 jun. 2017.

TYNER, J. W. et al. Kinase Pathway Dependence in Primary Human Leukemias Determined by Rapid Inhibitor Screening. **Cancer Research**, v. 73, n. 1, p. 285–296, 1 jan. 2013.

TYNER, J. W. et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. **Nature**, v. 562, n. 7728, p. 526–531, 17 out. 2018.

URAS, I. Z. et al. CDK6 coordinates JAK2V617F mutant MPN via NF- κ B and apoptotic networks. **Blood**, v. 133, n. 15, p. 1677–1690, 11 abr. 2019.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, 2016.

VAN GALEN, P. et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. **Cell**, v. 176, n. 6, p. 1265- 1281.e24, 7 mar. 2019.

VAN MALDEGEM, A. M. et al. **Ewing sarcoma: The clinical relevance of the insulin-like growth factor 1 and the poly-ADP-ribose-polymerase pathway** *European Journal of Cancer* Elsevier Ltd, , 1 jan. 2016.

VERDIER, F. et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 42, p. 26173–8, out. 1997.

VERHAAK, R. G. W. et al. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. **Haematologica**, v. 94, n. 1, p. 131–134, 1 jan. 2009.

VIALE, A. et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 628–632, 30 out. 2014.

VON MEHREN, M. et al. Linsitinib (OSI-906) for the treatment of adult and pediatric wild-type gastrointestinal stromal tumors, a SARC phase II study. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 8, p. 1837–1845, 15 abr. 2020.

WALTER, R. B. et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: A novel paradigm for treatment assignment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 33, p. 4417–4423, 20 nov. 2011.

WALTER, R. B.; APPELBAUM, F. R.; ESTEY, E. H. Optimal dosing of cytarabine in induction and post-remission therapy of acute myeloid leukemia. **Leukemia**, 16 dez. 2020.

WANDER, S. A.; FATHI, A. T.; LEVIS, M. J. **The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Quizartinib and beyond** *Therapeutic Advances in Hematology*, 2014.

WANG, C. et al. Identification of transaldolase as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma metastasis using xenografted mouse model and clinic samples. **Cancer Letters**, v. 313, n. 2, p. 154–166, 27 dez. 2011.

WANG, C.; YOULE, R. J. **The role of mitochondria in apoptosis** *Annual Review of Genetics* NIH Public Access, , 1 dez. 2009.

WANG, F. et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. **Science**, v. 340, n. 6132, p. 622–626, 3 maio 2013.

WANG, F. et al. Inhibition of insulin-like growth factor 1 receptor enhances the efficacy of sorafenib in inhibiting hepatocellular carcinoma cell growth and survival. **Hepatology communications**, v. 2, n. 6, p. 732–746, jun. 2018.

WANG, Y. H. et al. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. **Cell**, v. 158, n. 6, p. 1309–1323, 11 set. 2014.

WARAKY, A. et al. Nuclear insulin-like growth factor 1 receptor phosphorylates proliferating cell nuclear antigen and rescues stalled replication forks after DNA damage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 44, p. 18227–18239, 3 nov. 2017.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956.

WARD, P. S. et al. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. **Cancer Cell**, v. 17, n. 3, p. 225–234, 16 mar. 2010.

WARSITO, D. et al. Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. **EMBO Reports**, v. 13, n. 3, p. 244–250, mar. 2012.

WARSITO, D. et al. Nuclearly translocated insulin-like growth factor 1 receptor phosphorylates histone H3 at tyrosine 41 and induces SNAI2 expression via Brg1 chromatin remodeling protein. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42288–42302, 5 jul. 2016.

WATSON, A. et al. Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia. **Cell Death Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 21 dez. 2015.

WEIS, T. M. et al. Clinical considerations for the use of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 141, p. 125–138, set. 2019.

WHEATON, W. W. et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. **eLife**, v. 2014, n. 3, 13 maio 2014.

WICK, M. J. et al. Insulin Receptor-mediated p62dok Tyrosine Phosphorylation at Residues 362 and 398 Plays Distinct Roles for Binding GTPase-activating Protein and Nck and Is Essential for Inhibiting Insulin-stimulated Activation of Ras and Akt. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 42843–42850, 16 nov. 2001.

WIEMAN, H. L.; WOFFORD, J. A.; RATHMELL, J. C. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 4, p. 1437–1446, abr. 2007.

WITHERS, D. J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 900–904, 26 fev. 1998.

WUTZ, A. et al. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 745–749, 1997.

XIAO, H. et al. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF β 1–Smad3 signalling pathway. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 3, p. 504–513, 1 ago. 2010.

XIAOJUN, X. et al. Transketolase-like protein 1 (TKTL1) Is required for rap and full viability of human tumor cells. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1330–1337, 15 mar. 2009.

XIE, J. et al. Metformin selectively inhibits metastatic colorectal cancer with the KRAS mutation by intracellular accumulation through silencing MATE1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 23, p. 13012–13022, 9 jun. 2020.

XU, D. et al. The IGF2/IGF1R/Nanog Signaling Pathway Regulates the Proliferation of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 687, 29 jun. 2018.

XU, G. et al. Metformin ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 15–25, 1 out. 2015.

YAMAUCHI, T. et al. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 6, p. 3074–3084, jun. 1996.

YAO, C.-Y. et al. A 4-lncRNA scoring system for prognostication of adult myelodysplastic syndromes. **Blood Advances**, v. 1, n. 19, p. 1505–1516, 22 ago. 2017.

YATES, J. et al. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia - PubMed. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 57, n. 4, p. 485–488, 1973.

YE, J. et al. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 18, p. 6904–6909, 1 maio 2012.

YERUSHALMI, R. et al. Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) in breast cancer subtypes. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 1, p. 131–142, fev. 2012.

YU, H. et al. The Potential Effect of Metformin on Cancer: An Umbrella Review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 617, 18 set. 2019.

YUE, L. et al. HDAC11 deficiency disrupts oncogene-induced hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 135, n. 3, p. 191–207, 16 jan. 2020.

ZANDVAKILI, I. et al. **Ruxolitinib as first-line treatment in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: A second experience** *American Journal of Hematology* Wiley-Liss Inc., , 1 maio 2018.

ZHANG, H. et al. Clinical resistance to crenolanib in acute myeloid leukemia due to diverse molecular mechanisms. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2019.

ZHANG, Q.-S. et al. Metformin improves defective hematopoiesis and delays tumor formation in Fanconi anemia mice. **Blood**, v. 128, n. 24, p. 2774–2784, 15 dez. 2016.

ZICK, Y. **Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance**. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* Sci STKE, , 2005.

7. Anexos

7.1 Anexo A



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Investigação da função da proteína IRS2 em células hematopoéticas e dos efeitos celulares e moleculares da metformina em neoplasias mieloproliferativas*", registrado com o número **002/2016-1**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Fabiola 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 27 de junho de 2016.

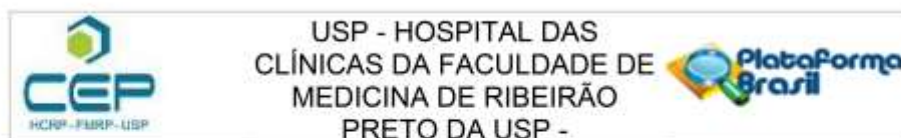
Este Protocolo prevê a utilização de 28 camundongos NOD/SCID gama fêmeas pesando 22g; 28 camundongos 129-IRS2 fêmeas pesando 22g e 28 camundongos 129-IRS2 machos pesando 22g, oriundos do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 27/06/2016 a 31/03/2018.

We certify that the Protocol n° 002/2016-1, entitled "*Investigation of IRS2 protein function in hematopoietic cells and cellular and molecular effects of metformin in myeloproliferative neoplasms*", 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 06/27/2016. 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 28 female NOD/SCID gama mice weighing 22g, 28 female 129-IRS2 mice weighing 22g and 28 male 129-IRS2 mice weighing 22g from the Laboratory of Experimental Studies in Animals of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 03/31/2018.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

7.2 Anexo B



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da eficiência antineoplásica de inibidores da via de sinalização IGF1R-IRS1/2 em leucemia mieloide aguda

Pesquisador: Fabiola Traina

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 40325820.0.0000.5440

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.417.538

Apresentação do Projeto:

A leucemia mieloide aguda (LMA) compreende um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula tronco hematopoética (CTH) de curso clínico grave. Os principais achados clínicos incluem neutropenia, plaquetopenia e anemia no sangue periférico, bem como do aumento de células mieloídes imaturas na medula óssea e sangue. O conhecimento da fisiopatologia da LMA permitiu a uniformização dos critérios diagnósticos e implementação de terapias direcionadas a alterações moleculares recorrentemente identificadas nos pacientes. Entretanto, a LMA persiste como uma doença com curso adverso e resultados clínicos insatisfatórios. A via de crescimento celular IGF1R-IRS1/2 vem sendo implicada nos processos de transformação e resistência a terapia em LMA.

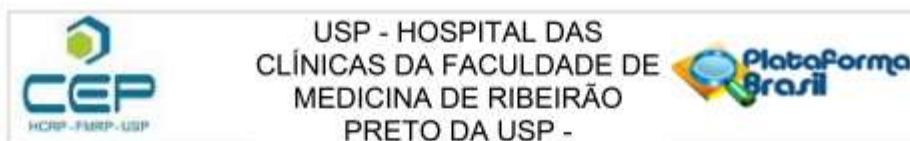
Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os efeitos citotóxicos de inibidores farmacológicos de IGF1R-IRS1/2 em células primárias de pacientes diagnosticados com leucemia mieloide aguda.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos ou desconfortos da pesquisa estão relacionados com o risco da quebra do sigilo de alguma informação. Informações sobre dados pessoais, condições de saúde e tratamentos, serão obtidas do prontuário do paciente. Todos os dados serão usados somente para a realização

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3802-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.417.538

da pesquisa. Mas, mesmo os pesquisadores se comprometendo a fazer todos os esforços para que as normas éticas sejam seguidas, existe o risco da quebra do sigilo de alguma informação. A fim de minimizar os riscos de quebra de sigilo, apenas a equipe de pesquisa terá acesso ao prontuário médico.

Benefícios: O paciente não terá nenhum benefício imediato por participar do estudo. As informações obtidas por este trabalho poderão auxiliar na melhoria do tratamento futuro de LMA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo experimental pré-clínico. A coorte será composta por pacientes (entre 18 e 65 anos) consecutivos diagnosticados com LMA em investigação no serviço de hematologia no HC FMRP USP. A LMA será definida usando os critérios da Organização Mundial da Saúde (SWERDLOW et al., 2017). Prevemos a inclusão de 20 pacientes. O cálculo do tamanho amostral foi definido por conveniência, baseado na estimativa do número de casos diagnosticados por ano na instituição.

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais serão coletados por revisão de prontuários médicos físicos e/ou eletrônicos. Parâmetros demográficos avaliados incluirão idade e sexo. Parâmetros clínicos e laboratoriais incluirão: entidade diagnóstica, LMA de novo ou secundária e os parâmetros laboratoriais avaliados serão parâmetros hematimétricos e alterações citogenéticas e moleculares recomendadas pelo ELN 2017 (DÖHNER et al., 2017), conforme disponíveis no prontuário médico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. Solicita a dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Serão analisados dados armazenados no prontuário médico (eletrônico) dos pacientes. Amostras excedente de sangue periférico ou medula óssea coletados para fins de exame de cariótipo (exame de rotina) serão utilizados para estudos in vitro apenas; não haverá armazenamento de material biológico.

Recomendações:

não se aplica

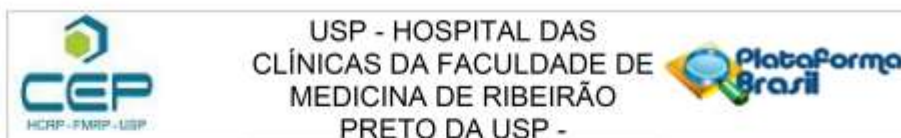
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 1 data 14/10/2020, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, 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

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: 4.417.538

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_1666907.pdf	23/11/2020 16:45:14		Aceito
Orçamento	AprovacaoOrçamento_IGF1R_LMA_2.pdf	23/11/2020 16:44:21	Fabiola Traina	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_InibidorIGF1R_LMA_v1_14102020_2.pdf	23/11/2020 16:42:32	Fabiola Traina	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoIGF1R_LMA_Ass.pdf	20/11/2020 12:56:11	Fabiola Traina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE_IGF1R_LMA_Ass.pdf	20/11/2020 12:55:58	Fabiola Traina	Aceito
Orçamento	OrçamentoDetalhado_InibidorIGF1R_LMA.pdf	20/11/2020 12:55:04	Fabiola Traina	Aceito
Cronograma	Cronograma_InibidorIGF1R_LMA.pdf	20/11/2020 12:54:47	Fabiola Traina	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 24 de Novembro 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

7.3 Anexo C

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA DAUNORRUBICINA COMO AGENTE ANTRACÍCLICO NA INDUÇÃO DE REMISSÃO E CONSOLIDAÇÃO DE PACIENTES COM LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

Pesquisador: Eduardo Magalhães Rego

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 3

CAAE: 81987818.5.1001.5440

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

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.003.975

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1049986.pdf, de 05/06/2018) e do Projeto Detalhado.

INTRODUÇÃO

A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) é um subtipo de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) que se caracteriza pela parada da maturação do precursor mielóide no estágio de promielócito. Corresponde a cerca de 10% dos casos de LMA com incidência de 10.000 casos nos Estados Unidos em 2001. Entretanto, em alguns países, como Brasil e México a proporção de casos de LPA entre as LMAs é maior, situando-se entre 20 e 30%. Além das características morfológicas e citoquímicas peculiares, clinicamente apresenta-se com um quadro de coagulopatia que é o responsável pela maior morbidade dos pacientes. Do ponto de vista molecular, aproximadamente 95% dos casos de LPA apresentam uma translocação balanceada entre os cromossomos 15 e 17 (loci q22 e q21, respectivamente), gerando o gene PML-RAR. As consequências na regulação do ciclo celular e na terapêutica desta doença decorrentes desta alteração genética são de tal forma peculiares que, em 2001, a Organização Mundial de Saúde em sua reclassificação das hemopatias categorizou esta entidade como LMA com t(15;17). As recomendações atuais para o tratamento da

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

leucemia promielocítica aguda de novo baseiam-se no uso do ácido all-trans-retinóico (ATRA) e quimioterapia com antracíclicos para indução de remissão, seguida de quimioterapia com antracíclicos para consolidação e baixa dose de quimioterápicos associada a ATRA para manutenção¹. Utilizando ATRA e monoterapia com antracíclico o grupo cooperativo espanhol PETHEMA (Programa de Estudio y Tratamiento de lãs Hemopatías Malignas) - estudo LPA96 - relatou taxas de remissão completa em torno de 90% e sobrevida livre de doença em 5 anos próxima de 80%³⁻⁸. Baseado nos resultados de dois estudos clínicos randomizados o grupo PETHEMA demonstrou a existência de fatores de risco (contagem plaquetária menor que 40.000x10⁶/ml e de leucocitária maior que 10.000x10⁶/ml)⁹ e adaptou o tratamento conforme grupos de risco. De acordo com esta classificação, os pacientes classificados com alto risco ou risco intermediário receberam ATRA durante a terapia de consolidação em combinação com antracíclico em monoterapia com dose intensificada. Recentemente, o grupo PETHEMA relatou os resultados obtidos em 251 pacientes com LPA de novo (PML/RAR positivo), alocados consecutivamente e que foram incluídos neste protocolo. Estes resultados foram comparados com os resultados atualizados de 175 pacientes que haviam sido incluídos no protocolo LPA969, e as principais conclusões foram:

- i) As taxas de remissão em ambos os protocolos confirmaram a virtual ausência de resistência primária ao ATRA associado a monoterapia com idarrubicina (AIDA);
- ii) A consolidação com intensificação para pacientes com risco intermediário e alto claramente levou a melhora significativa da eficácia antileucêmica neste contexto e;
- iii) As doses maiores de idarrubicina e a adição de ATRA nos três ciclos de consolidação, apesar de aumentarem moderadamente a toxicidade hematológica, mantiveram um alto grau de fidelidade ao protocolo proposto, sem aumentar os óbitos relacionados à toxicidade.¹ Tendo em vista tais resultados, o grupo espanhol propôs um novo protocolo de estudo, denominado LPA2005, cujas mudanças foram: 1. redução da dose de mitoxantrone na consolidação nos grupos de médio e baixo risco; e, conforme resultados relatados pelo grupo italiano GIMEMA (Grupo Italiano Malattie Emlatologiche dell'Adulto) em pacientes de alto risco com idade inferior a 60 anos¹⁰, acrescentou-se Ara-C® à consolidação. Baseado no benefício demonstrado em dois estudos randomizados^{1,6}, o Consórcio Internacional em Leucemia Mielóide Aguda, vinculado à Sociedade Americana de Hematologia (ASH) concordou em conceber um protocolo a ser seguido como um estudo multicêntrico não-randomizado em três países em desenvolvimento :Brasil, México e Jordânia com o mesmo princípio do protocolo LPA2005 dos grupos PETHEMA/HOVON. Os objetivos, critérios de elegibilidade, tratamento e avaliação não foram alterados, exceto por

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

testar a eficácia e toxicidade da daunorrubicina no lugar da idarrubicina (por equivalência, 5 mg de daunorrubicina são iguais a 1 mg de idarrubicina). Após o seu início houve mudança dos países participantes, sendo que o México e a Jordânia se retiraram do Consórcio por opção própria e o Chile, Paraguai, Uruguai e Peru se tornaram participantes. Por se tratar de um estudo tipo registro, não foram necessárias mudanças no desenho do mesmo, desde o início de sua execução. O modelo dos estudos do PETHEMA foi considerado o mais apropriado para aplicação nos países em desenvolvimento porque demonstraram previamente:

- i)Alta eficácia antileucêmica;
- ii)Baixa toxicidade e alto grau de tolerabilidade;
- iii)Baixo custo e simplicidade de aplicação e;
- iv)Reprodutibilidade bem-sucedida em uma rede emergente de numerosas instituições participantes em vários países com diferentes níveis de cuidado hospitalar. Além da eficácia clínica, serão avaliados, também, alguns parâmetros laboratoriais da doença, que incluem estudos de distúrbios da hemostasia, imunofenótipo e marcadores biomoleculares da doença. As análises laboratoriais serão conduzidas por laboratórios locais de cada centro e o exame para detecção do rearranjo PML/RARA será centralizado por país, e não haverá envio de amostras ao exterior. No caso do Brasil, o laboratório central será o Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

HIPÓTESE

A combinação de ATRA com daunorrubicina tem eficácia e segurança similares ao tratamento com ATRA e idarrubicina para o tratamento de indução e consolidação da remissão de pacientes com LPA.

METODOLOGIA

Estudo de registro prospectivo multicêntrico. Os dados clínicos e laboratoriais serão registrados usando plataforma on line, e, fichas de registro clínico padronizadas. A confirmação diagnóstica e o monitoramento serão realizados por método de biologia molecular em laboratório central. Os desfechos do tratamento tais como: sobrevida global, sobrevida livre de recaídas, taxa cumulativa de recaída e taxa de mortalidade não relacionada ao tratamento serão calculados usando método de Kaplan Meyer.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

Idade menor ou igual a 75 anos.

ECOG performance status menor ou igual a 3.

Diagnóstico morfológico de LPA (FAB-M3 ou M3v). Casos sem morfologia típica mas com o rearranjo PMLRARA também serão incluídos.

Diagnóstico genético: t(15;17) demonstrada por cariótipo convencional; rearranjo PML-RARA detectado por RT-PCR ou FISH ou padrão micro-salpicado da proteína PML à imunofluorescência com anticorpo monoclonal anti-PG-M3. Obviamente, o tratamento poderá ser iniciado baseado em um diagnóstico presuntivo morfológico e o resultado destes testes ser posterior ao início da quimioterapia.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Quimioterapia ou radioterapia para o tratamento de neoplasia prévia.

Presença de neoplasia associada.

Presença de doença psiquiátrica grave.

Soropositividade para HIV.

Contra-indicação a quimioterapia intensiva, especificamente a antraciclicos.

Creatinina sérica maior ou igual a 3,5mg/dL.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS PRIMÁRIOS

1. Avaliar a eficácia e toxicidade de um protocolo com abordagem terapêutica adaptada ao risco que utilize daunorrubicina no lugar da idarrubicina com a equivalência de dose de 5:1, nas terapias de indução e consolidação em pacientes com LPA.
2. Avaliar o impacto da redução da dose de mitoxantrone na sobrevida livre de eventos, livre de doença e sobrevida geral assim como a incidência cumulativa de recaída em pacientes de risco baixo e intermediário.
3. Avaliar o impacto da adição de ara-C aos ciclos de consolidação com daunorrubicina (utilizados originalmente nos protocolos GIMEMA) na sobrevida livre de eventos, livre de doença e sobrevida geral, assim como a incidência cumulativa de recaída em pacientes de alto risco com idade inferior a 60 anos com LPA no Brasil.
4. Avaliar a toxicidade das terapias de indução, consolidação, e manutenção nos subgrupos de tratamento e na população de pacientes com LPA.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Comparar os resultados com os obtidos no protocolo PETHEMA/HOVON LPA2005.
2. Avaliar parâmetros laboratoriais da coagulação e fibrinólise.
3. Avaliar o imunofenótipo da célula leucêmica.
4. Avaliar a expressão de marcadores moleculares da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conteúdo não analisado pela CONEP, pois o presente projeto de pesquisa foi considerado aprovado anteriormente pelo Sistema CEP/Conep.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Respostas ao Parecer Consubstanciado CONEP nº 2.791.373 de 02/08/2018.

Trata-se de submissão de resposta às pendências elencadas pela Conep no processo de validação documental na Plataforma Brasil (PARECER Nº 20-SEI/2017-CONEP/SECNS/MS). Protocolo inicialmente registrado na Conep sob Registro Conep nº 12920 (incluído na área temática "Cooperação estrangeira") aprovado com recomendações em 11/09/2006 (Parecer Consubstanciado Conep nº 942/2006) e com várias emendas subsequentes.

Estudo tipo registro, prospectivo, multicêntrico, para avaliar a eficácia e toxicidade do tratamento com daunorrubicina e ATRA, quando comparado ao tratamento de idarrubicina e ATRA, na terapia de indução e consolidação em pacientes com leucemia promielocítica aguda (LPA).

Todos os participantes receberão o tratamento padrão recomendado pelas diretrizes da Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ABHH) (ATRA e quimioterapia com antracíclicos). Os riscos associados às medicações são bem conhecidos e o manejo das toxicidades são os mesmos utilizados para pacientes não incluídos no estudo.

As instituições participantes registrarão os pacientes elegíveis no banco de dados utilizando o Programa RedCAP on line (redcap.fmrp.usp.br). Os dados clínicos e laboratoriais serão registrados usando fichas de registro clínico padronizadas. Serão registradas informações sobre resultados laboratoriais, sobre a atividade da doença (remissão ou não), registro de eventuais efeitos adversos e sobre a sobrevida. A confirmação diagnóstica e o monitoramento, serão realizados por detecção do rearranjo PML/RARA por PCR em laboratório central (Laboratório de Hematologia de

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

Ribeirão Preto - USP).

Estudo financiado pelo Consórcio Internacional em Leucemia Prolifocítica (IC-APL), vinculado à Sociedade Americana de Hematologia (ASH), e pelo Centro de Terapia Celular (Projeto FAPESP 98/14247-6).

LISTA ATUALIZADA DE CENTROS PARTICIPANTES (de acordo com o documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1049986.pdf" de 05/06/2018):

1. Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Pesquisador Responsável: Elenaide Coutinho Nunes)
2. Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais (Pesquisador Responsável: Evandro Maranhão Fagundes)
3. Universidade Federal de Santa Catarina (Pesquisador Responsável: Giovanna Steffenello Durigon)
4. Disciplinas de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Oncologia Clínica - UNIFESP (Pesquisador Responsável: Fabio Rodrigues Kerbaury)
5. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (Pesquisador Responsável: Teresa Cristina Bortolheiro)
6. Centro de Hematologia e Hemoterapia – HEMOCENTRO (Pesquisador Responsável: Katia Borgia Barbosa Pagnano)
7. HEMOLABOR - Hematologia e Laboratório de Pesquisas Clínicas Ltda. (Pesquisador Responsável: Nelcivone Soares De Melo)
8. Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco – HEMOPE (Pesquisador Responsável: Raul Antonio Morais Melo)
9. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Pesquisador Responsável: Rosane Isabel Bittencourt)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em resposta ao Parecer Consubstanciado CONEP nº 2.791.373 de 02/08/2018 foram postados os seguintes documentos (30/10/2018):

- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1049986.pdf de 30/10/2018

•

Justificativa_da_necessidade_e_oportunidade_uso_futuro_amostras_biologicas_armazenadas_do_estudo.pdf

- Justificativa_necessidade_oportunidade_Utilizacao_Material_Biologico.pdf
- Respostas_Pendencias_Conforme_Parecer_CONEP.pdf

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

- Resposta_Pendencias_Conforme_Parecer_Conep.doc
- Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_3_24agosto2018_final.doc
- Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_3_de_24agosto2018_com_alteracao_destacada.doc
- Justificativa_quanto_a_necessidade_e_oportunidade_utilizacao_amstras.docx
- Justificativa_Hemorio.pdf
- Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_versao_final_3_0_de_24_08_2018.docx
-
- Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_versao_3_0_de_24_08_2018_com_alteracoes_destacadas.docx
- Termo_de_acordo_entre_os_centros_participantes.doc
- Termo_de_acordo_entre_os_centros_participantes.pdf
- Lista_de_Paises_Participantes.docx
- Justificativa_Hemorio.docx

Documentos postados na submissão inicial (05/06/2018):

- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1049986.pdf de 05/06/2018
- Parecer_N20_SEI_2017_CONEP_SECNS_MS.pdf
- Resposta_as_Pendencias_Documentais_CONEP_maio_de_2018.doc
- Respostas_as_Pendencias_Documentais_da_CONEP.pdf
- TCLE_com_alteracoes_destacadas.docx
- Parecer_de_Aprovacao_com_recomendacoes_da_CONEP_N942_2006_emitido_em_11set_2006.pdf
- Justificativa_da_Emenda_Contendo_as_respostas_do_Parecer_N20_2017_CONEP.pdf
- Justificativa_da_Emenda_Contendo_as_respostas_das_Pendencias_do_ParecerN20_2017_CONEP.docx
- Projeto_ICAPL_Projeto_inicial.doc
- PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2485452_05_02_2018.pdf
- Relacao_de_Centros_Participantes.doc
- Paginas_de_CRF_RedCap.pdf
- Declaracao_sobre_TCLE_amostra_biologica.pdf
-

Declaracao_sobre_o_termo_de_consentimento_de_solicitacao_de_autorizacao_para_coleta_material_biologico.docx

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

- Carta_de_Submissao_Protocolo_ao_CEP.pdf
- Carta_de_Submissao_Protocolo_ao_CEP.docx
- Biorrepositorio.doc
- Processo_HCRP_N8723_06_banco_de_amostras.pdf
- Relatorio_sobre_Eventos_Adversos_do_Protocolo.pdf
- Relatorio_sobre_os_Eventos_Adversos_do_Protocolo.doc
- Informacao_inicial_sobre_conducao_do_estudo_no_Brasil_e_sobre_amostras_biologicas.pdf
- Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido-versao_2_de_19_10_2017.docx
- Protocolo-versao_1_de_2006_Emenda_2_de_outubro_de_2017.doc
- Orcamento.docx
- Amostras_Biologicas_uso_e_destinacao.docx
- Declaracao_de_submissao_ao_sistema_CEI.docx
- DECLARACAO_DE_CONFIDENCIALIDADE_DO_PARTICIPANTE_DA_PESQUISA_NO_ESTUDO.docx
- Declaracao_de_Infraestrutura_e_instalacoes.docx
- Parecer_Consubstanciado_Aprovacao_Inicial_CEP.pdf
- Oficio_Aprovacao_Inicial_CEP.pdf
- Amostras_Biologicas_Usa_e_Destinacao.pdf
- Declaracao_sobre_amostras_biologicas_envolvendo_mais_de_uma_instituicao.pdf
- Declaracao_de_submissao_ao_sistema_CEP_CONEP_em_caso_de_novos_estudos.pdf
- Declaracao_de_Confidencialidade_do_Participante_da_Pesquisa.pdf
- Declaracao_Infraestrutura.pdf
- Cronograma_de_Execucao_e_Atualizacao.doc
- Cronograma_Inicial.pdf
- Folha_de_Rosto.pdf

Recomendações:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise de respostas ao Parecer Consubstanciado CONEP nº 2.791.373 de 02/08/2018 e ao Parecer Consubstanciado CONEP Nº 20-SEI/2017-CONEP/SECNS/MS:

1. Quanto ao Protocolo de Pesquisa, intitulado "Documento 03 - Protocolo versão 1 de 2006 - Emenda1 de junho de 2017", seguem as seguintes considerações:

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

sistema Cure4Kids seja mantido por um hospital pediátrico, o presente estudo não incluiu e não inclui crianças.

Até o momento, a inclusão de pacientes em todos os centros envolvido não atingiu o número esperado e o acompanhamento foi em média 48 meses, portanto menor que o necessário conforme o protocolo. Como o número de pacientes recrutados foi inferior ao estimado originalmente, a prorrogação dos trabalhos, visa aumentar o número de sujeitos e principalmente o tempo de observação. Por se tratar de um estudo tipo registro, não foram necessárias mudanças no desenho do mesmo, desde o início de sua execução.

Inicialmente os dados começaram a ser incluídos na Programa de Cadastro de Pacientes online (<https://www.cure4kids.org>).

Este instrumento mostrou-se inadequado, pois é uma ferramenta para a faixa etária e característica infantil e os pacientes alvo deste estudo são pacientes adultos, passamos a utilizar o REDCAP. Todos os dados foram transferidos para tal sistema.

As amostras dos pacientes estão armazenadas no banco de amostras de células de medula óssea e sangue no Laboratório de Hematologia, aprovado em reunião ordinária de número 234, do Comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, realizada em 25.09.2006 processo HCRP nº8723/2006 e atualmente modificado para Biorrepositório, projeto enviado em anexo para atender aos requisitos da Portaria 2.201 – 14/09/2011 – MS. As alterações realizadas encontram-se destacadas.

Devemos ressaltar que os países em desenvolvimento, participante deste estudo, seguem o mesmo protocolo de procedimentos e procedimentos, porém cada um conta com um centro coordenador e os devidos centros participantes.

Não haverá consórcio, partilhamento e envio de amostras de material biológico entre eles apenas os dados do estudo serão compartilhados nas reuniões acima citadas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Considerando que haverá recrutamento de participantes em outros países, solicita-se incluir no item "Países de Recrutamento" do cadastro da Plataforma Brasil os países Chile, Paraguai, Urugual e Peru.

RESPOSTA: Enviado lista de Países participantes e incluídos os Países no item correspondente da Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

NOVA PENDÊNCIA APÓS ANÁLISE DAS RESPOSTAS AO PARECER CONSUBSTANCIADO CONEP Nº 20-SEI/2017-CONEP/SECNS/MS:

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5677 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

No documento "Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_2_de_outubro_de_2017.doc" postado em 09/01/2018 lê-se "No Brasil, além de Ribeirão Preto, participação deste estudo [...] o Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO)...". Entretanto, a referida instituição participante não consta na relação de centros participantes elencados nos documentos "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1049986.pdf" de 05/06/2018 e "Relacao_de_Centros_Participantes.doc" postado na Plataforma Brasil em 12/01/2018. Solicitam-se esclarecimentos e adequação dos documentos citados.

RESPOSTA: O centro Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), foi retirado do protocolo conforme emenda incluída na Plataforma Brasil, "Protocolo versão 1 de 2006 – Emenda 3 de 24Ago2018, anexada também justificativa da supressão da referida instituição.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.2. Na página 13 de 52, lê-se: "O seguinte material deverá ser colhido ao diagnóstico e enviado ao Laboratório de Hematologia do HCRP que assumirá a responsabilidade de guarda e diagnóstico confirmatório genético". E na página 14 de 52, lê-se: "Os procedimentos recomendados para envio de amostras e guarda do material biológico estão no Item 4.1.1. O Laboratório de Hematologia do HCRP assumirá a responsabilidade pela coleta, arquivamento e diagnósticos genéticos centralizados". A análise do Protocolo de Pesquisa indica que há formação de biorrepositório. Assim sendo, todos os aspectos relativos à formação de biorrepositório ao longo da execução de uma pesquisa deverão ser seguidos conforme explicitado na Resolução CNS nº 441 de 2011 e Portaria MS nº 2201 de 2011, ainda que o armazenamento do material biológico seja temporário sem previsão de uso futuro. Solicita-se uma revisão das referidas normativas e apresentar:

1.2.1. Justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura das amostras biológicas armazenadas no estudo em tela (Item 2.I da Resolução CNS nº 441 de 2011), se pertinente.

RESPOSTA: Vide Item 1.1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. Solicita-se apresentar justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura das amostras biológicas armazenadas no estudo em tela (Item 2.I da Resolução CNS nº 441 de 2011), se pertinente.

RESPOSTA: Justificativa apresentada "Justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura das amostras biológicas armazenadas do estudo"

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

1.2.2. Declaração de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado em biorrepositório será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) (Item 2.III da Resolução CNS nº. 441 de 2011), se pertinente.

RESPOSTA: Vide item 1.1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2.3. Regulamento dos laboratórios envolvidos no armazenamento do material biológico: detalhamento operacional e de infraestrutura, bem como, as condições de armazenamento do material, que podem estar contidos no projeto de pesquisa detalhado ou em forma de declaração. Cabe ressaltar que o prazo de armazenamento de material biológico humano em biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até dez anos. Solicita-se explicitar no projeto de pesquisa o tempo de armazenamento.

RESPOSTA: Vide item 1.1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2.4. Termo de Acordo em Pesquisa envolvendo mais de uma instituição, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado no Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados.

RESPOSTA: Vide item 1.1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. Solicita-se apresentar Termo de Acordo firmado entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados, conforme previsto no TCLE. Explicitando ainda o tipo e a quantidade dos materiais compartilhados, informando sua destinação após a utilização (Itens 13 e 13.I, da Resolução CNS nº 441 de 2012).

RESPOSTA: Apresentado termo de acordo entre os centros participantes assinado pelo coordenador do projeto no Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

1.2.5. Declaração garantindo aos pesquisadores e às instituições brasileiras o direito ao acesso e utilização do material biológico humano armazenado no exterior (Item 14 da Resolução CNS nº 441 de 2011).

RESPOSTA: Vide item 1.1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA. Não se aplica, conforme consta no documento "Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_2_de_outubro_de_2017.doc".

1.2.6. Compromisso dos pesquisadores no exterior quanto à vedação do patenteamento e da utilização comercial do material biológico humano armazenado em Biorrepositório (Item 16 da Resolução CNS nº 441 de 2011); RESPOSTA: Vide item 1.1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA. Não se aplica, conforme consta no documento "Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_2_de_outubro_de_2017.doc".

1.2.7. Em relação ao envio de material biológico ao exterior, o pesquisador e a instituição nacional devem estar atentos às normas e disposições legais sobre remessa de material para o exterior e às que protegem a propriedade industrial e/ou transferência tecnológica (Lei nº 9.279 de 14/05/96 que regula os direitos e obrigações relativas à propriedade industrial, Decreto nº 2.553/98 que a regulamenta e Lei nº 9.610/98 sobre direito autoral).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA. Não se aplica, conforme consta no documento "Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_2_de_outubro_de_2017.doc".

1.3. Na página 16 de 52, lê-se: "As instituições devem registrar os pacientes elegíveis ao estudo na webpage do IC-APL, disponível 24 horas por dia, 7 dias por semanas, utilizando o Programa de Cadastro de Pacientes online (<https://www.cure4kids.org>)". (Destaque nosso) Considerando que o referido banco de dados é um recurso online dedicado a melhorar o atendimento de crianças doentes (câncer e outras doenças), solicita-se esclarecimento se no estudo há menores de idade, e caso necessário, a submissão de documentos relacionados a estes participantes, tais como: termo de assentimento e TCLE para pais/responsável legal, para a devida apreciação ética.

RESPOSTA: Vide item 1.1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.4. Na página 44 de 52, lê-se: "Os exames laboratoriais gerais (hemograma, enzimas hepáticas, avaliação renal, provas de hemostasia, teste gestacional e mielograma), assim como o

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

ecocardiograma, são os usualmente utilizados no seguimento dos pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda e não haverá acréscimo de custos relacionado a estes". Ainda que os custos do projeto de pesquisa sejam cobertos pelo SUS, tais gastos devem ser devidamente especificados no orçamento financeiro detalhado, conforme preconizado pelo item 3.3.e. da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013. Ademais, para que uma pesquisa seja financiada pelo SUS, deve-se apresentar a anuência dos gestores responsáveis. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: "Orçamento.docx".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.5. O cronograma do estudo não está adequado, pois só informa as etapas do estudo até Julho/2017 enquanto o protocolo de pesquisa explicita o término em abril de 2021. Sendo assim, solicitam-se esclarecimentos e a adequação do cronograma. Ressalta-se ainda a necessidade de adequação, de forma que o cronograma descreva a duração total e as diferentes etapas da pesquisa (Item 3.3.f da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

RESPOSTA: "Cronograma_de_Execucao_e_Atualizacao.doc"

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao documento Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B do protocolo de pesquisa), seguem as seguintes considerações:

2.1. O Termo de Consentimento é o documento no qual é explicitado o consentimento livre e esclarecido do participante e/ou de seu responsável legal, de forma escrita, devendo conter todas as informações necessárias, em linguagem clara e objetiva, de fácil entendimento, para o mais completo esclarecimento sobre a pesquisa. Solicita-se que seja realizada uma revisão em todo o TCLE, conforme as normas gramaticais de português, tornando, desta forma, o texto mais claro, objetivo e de fácil entendimento (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.23 e IV.1.b).

RESPOSTA: Revisado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Na 1ª página, lê-se: "A principal mudança que será feita no tratamento é a adição troca da Idarrubicina pela Daunorrubicina" (Destaque nosso). Para um melhor esclarecimento do participante da pesquisa, solicita-se suprimir a palavra "adição" do trecho acima.

RESPOSTA: Suprimido o termo.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.3. Na 1ª página, lê-se: "Concordando em participar, apenas seriam feitos novos exames, nas amostras já colhidas", (Destaque nosso). Solicita-se descrever no TCLE os procedimentos a serem realizados na pesquisa, pontuando que análises serão realizadas nas amostras biológicas e o objetivo de cada análise (por exemplo: TGO e TGP - para saber a função do seu fígado), conforme disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.a. RESPOSTA: Revisado e refeito conforme solicitado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.4. Na 2ª página, lê-se: "Apesar de todos estes problemas, não existe tratamento para leucemia aguda que não apresente riscos." No TCLE há menção apenas dos riscos decorrentes dos medicamentos do estudo, não há esclarecimento sobre outras possíveis complicações decorrentes dos procedimentos da pesquisa. Solicita-se adequação (Resolução CNS nº 466 de 2012, item II.22).

RESPOSTA: Revisado e modificado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.5. As informações acerca dos potenciais benefícios em participar do estudo devem ser descritas de forma específica, clara e objetiva. Solicita-se adequação do TCLE, explicando, em linguagem clara e acessível, os potenciais benefícios relacionados à participação no estudo (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.1.b e IV.3.b).

RESPOSTA: Redação modificada para melhor entendimento.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.6. Na 2ª página, lê-se: "A equipe médica que o assiste e o hospital a que esta pertence asseguram-lhe pronta assistência e disponibilidade de meios para qualquer intercorrência". (Destaque nosso) O TCLE deve assegurar, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita (pelo patrocinador), pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.3.1 e II.3.2).

RESPOSTA: Redação modificada conforme sugestão.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

2.7. Solicita-se explicitar no TCLE a garantia do direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h).

RESPOSTA: Informado conforme o solicitado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.8. Deve ser assegurado ao participante de pesquisa o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo. Sendo assim, solicita-se que seja garantindo, de forma clara e objetiva, o ressarcimento de todas as despesas do participante da pesquisa e de seu acompanhante quando necessário, em decorrência de sua participação na pesquisa, podendo-se citar como exemplo, e não restringindo, o transporte e a alimentação (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.21 e IV.3.g).

RESPOSTA: Não é previsto ressarcimento de despesas pois o paciente não comparece ao local de tratamento especificamente para pesquisa e sim para submissão a fases do protocolo do tratamento da instituição.

ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Solicita-se incluir no TCLE a garantia de que o participante não terá quaisquer custos pela participação na pesquisa e que ele (a) não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou teste exigido pela pesquisa.

RESPOSTA: TCLE foi esclarecido o fato de não haver custos pela participação na pesquisa e ônus com: medicação, procedimentos ou testes exigidos pela pesquisa. Esta pendência para ser atendida, gerou o TCLE versão 3.0 de 24 de agosto de 2018.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.9. Na 2ª página, lê-se: "Tendo isso em vista, o grupo de pesquisadores acima gostaria de solicitar ao(à) senhor(a) que participe deste estudo". (Destaque nosso) O TCLE deve seguir a terminologia da Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV, e ser apresentado ao participante da pesquisa em forma de convite. Diante disso, solicita-se substituir o termo "solicitar" por "convidar".

RESPOSTA: Modificado conforme observação.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.10. Na 2ª página, lê-se: "O grupo de pesquisadores solicita, também, que possa manter guardadas (congeladas) amostras de medula óssea e sangue do senhor (a), que sobraem dos

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

exames realizados para alguma pesquisa posterior, mantendo sua identidade em segredo e sem cobrar-lhe nada" (Destaque nosso). Considerando que a confidencialidade e o sigilo são direitos do participante de pesquisa e que para manter a eticidade na pesquisa devem ser previstos procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, solicita-se garantir ao participante de pesquisa que estes dados serão utilizados exclusivamente para os fins desta pesquisa, assegurando o anonimato quando do repasse dos dados (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.2.i e IV.3.e).

RESPOSTA: Revista e modificada a redação.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.11. Na 3ª página, lê-se: "Na hipótese do material ser utilizado para outra pesquisa, nova autorização será solicitada ao senhor". (Destaque nosso) As amostras biológicas armazenadas podem ser utilizadas em pesquisas futuras, desde que previamente aprovadas pelo Sistema CEP/Conep. Sendo assim, solicita-se descrever no TCLE que cada nova pesquisa realizada pelo patrocinador ou por pesquisadores independentes está condicionada a: (a) apresentação de novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Sistema CEP/Conep e (b) re consentimento do participante de pesquisa por meio de um TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa. Ressalta-se ainda que, se houver intenção de pesquisa futura com o material biológico, essa informação deverá constar claramente do TCLE (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 6; Portaria MS nº 2.201 de 2011, capítulo IV, seção II, artigos 17º, 18º e 22º e capítulo II, artigo 5º).

RESPOSTA: Modificado para solicitação de assinatura de novo TCLE, caso o material armazenado possa ser utilizado em uma nova da pesquisa aprovada pelo CEP.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.12. Solicita-se que seja informado no TCLE que a retirada do consentimento de guarda das amostras biológicas humanas armazenadas em banco deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, e que darse-á a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 10.I).

RESPOSTA: Revisado e informado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

2.13. Solicita-se que conste no TCLE que o participante da pesquisa será informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do biorrepositório, quando for o caso (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 8).

RESPOSTA: Revisado e informado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.14. De acordo com a Resolução CNS nº 466 de 2012, lê-se: "IV.4.a. - explicitar, quando pertinente, os métodos terapêuticos alternativos existentes". Para o completo esclarecimento do participante de pesquisa, solicita-se inserir no TCLE a informação sobre as alternativas terapêuticas ao tratamento proposto.

RESPOSTA: Revisado e informado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.15. Solicita-se que conste neste documento informação de que o TCLE é elaborado em duas VIAS, que deverão ser assinadas ao final pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s). Salienta-se que os campos de assinatura de ambos deverão estar na mesma página (folha), conforme disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d. RESPOSTA: Revisado e informado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.16. Não foi apresentada nenhuma forma de contato com o CEP responsável pelo acompanhamento do estudo. Sendo assim, solicita-se constar em ambas as vias do TCLE nome, endereço, contato telefônico e horário de funcionamento do CEP responsável pelo estudo (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d). Para melhor informar o participante da pesquisa, solicita-se incluir no TCLE uma breve descrição do que é o CEP e qual sua função no estudo.

RESPOSTA: Revisado e informado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Considerando as normas e diretrizes éticas vigentes, nas quais os direitos dos participantes de pesquisa estão melhor esclarecidos, mais bem evidenciados, solicita-se realizar o re consentimento dos participantes ativos no estudo por meio da versão atualizada do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Conforme Item 2 deste parecer).

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

RESPOSTA: Este procedimento será realizado em pacientes ainda no estudo. Com relação aos óbitos e abandono de tratamento, caso houver, serão informados ao CEP.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Quanto ao Relatório Parcial, intitulado "Relatório Parcial conforme modelo CONEP": De acordo com os dados apresentados no relatório, foram registrados 78 eventos adversos sérios. Solicita-se apresentar análise crítica destes eventos, em que conste a análise de causalidade, de gravidade, as condutas especificamente adotadas para a assistência do participante e seus desfechos.

RESPOSTA: Esta análise fará parte do pacote de respostas à este órgão.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1049986.pdf	30/10/2018 14:04:53		Aceito
Outros	Justificativa_da_necessidade_e_opportunidade_uso_futuro_amostras_biologicas_armazenadas_do_estudo.pdf	30/10/2018 14:00:07	Marta Leoni	Aceito
Outros	Justificativa_necessidade_opportunidade_Utilizacao_Material_Biologico.pdf	30/10/2018 13:55:37	Marta Leoni	Aceito
Outros	Respostas_Pendencias_Conforme_Parecer_CONEP.pdf	30/10/2018 13:49:32	Marta Leoni	Aceito
Outros	Resposta_Pendencias_Conforme_Parecer_Conep.doc	30/10/2018 13:45:29	Marta Leoni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_3_24agosto2018_final.doc	04/10/2018 11:41:51	Marta Leoni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_3_de_24agosto2018_com_alteracao_de_stacada.doc	04/10/2018 11:41:24	Marta Leoni	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-049
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

Outros	Justificativa_quanto_a_necessidade_e_oportunidade_utilizacao_amstras.docx	04/10/2018 11:38:29	Marta Leoni	Aceito
Outros	Justificativa_Hemorio.pdf	04/10/2018 11:37:36	Marta Leoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Escarecido_versao_final_3_0_de_24_08_2018.docx	27/09/2018 11:56:30	Marta Leoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Escarecido_versao_3_0_de_24_08_2018_com_alteracoes_destacadas.docx	27/09/2018 11:56:05	Marta Leoni	Aceito
Outros	Termo_de_acordo_entre_os_centros_participantes.doc	31/08/2018 13:03:44	Marta Leoni	Aceito
Outros	Termo_de_acordo_entre_os_centros_participantes.pdf	31/08/2018 13:02:32	Marta Leoni	Aceito
Outros	Lista_de_Paises_Participantes.docx	31/08/2018 13:01:37	Marta Leoni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Justificativa_Hemorio.docx	29/08/2018 10:58:41	Marta Leoni	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_N20_SEI_2017_CONEP_SECNS_MS.pdf	05/06/2018 09:41:03	Marta Leoni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Resposta_as_Pendencias_Documentais_CONEP_maior_2018.doc	23/05/2018 10:09:58	Marta Leoni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Respostas_as_Pendencias_Documentais_da_CONEP.pdf	23/05/2018 10:09:31	Marta Leoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_com_alteracoes_destacadas.docx	23/05/2018 10:07:53	Marta Leoni	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_de_Aprovacao_com_recomendacoes_da_CONEP_N942_2006_emitido_em_11set_2006.pdf	11/05/2018 11:55:11	Marta Leoni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Justificativa_da_Emenda_Contendo_as_respostas_do_Parecer_N20_2017_CONEP.pdf	11/05/2018 11:13:59	Marta Leoni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Justificativa_da_Emenda_Contendo_as_respostas_das_Pendencias_do_Parecer_N20_2017_CONEP.docx	11/05/2018 11:06:33	Marta Leoni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ICAPL_Projeto_inicial.doc	11/05/2018 11:04:46	Marta Leoni	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2485452_05_02_2018.pdf	27/04/2018 14:08:19	Marta Leoni	Aceito
Outros	Relacao_de_Centros_Participantes.doc	12/01/2018 13:50:50	Eduardo Magalhães Rego	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.003.975

Outros	Paginas_de_CRF_RedCap.pdf	12/01/2018 13:48:14	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_sobre_TCLE_amostra_biologica.pdf	12/01/2018 13:46:50	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_sobre_o_termo_de_consentimento_de_solicitacao_de_autorizacao_para_coleta_material_biologico.docx	12/01/2018 13:46:07	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Outros	Carta_de_Submissao_Protocolo_ao_CEP.pdf	12/01/2018 13:42:17	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Outros	Carta_de_Submissao_Protocolo_ao_CEP.docx	12/01/2018 13:41:31	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Outros	Biorrepositorio.doc	09/01/2018 12:33:07	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Outros	Processo_HCRP_N8723_06_banco_de_amostras.pdf	09/01/2018 12:30:57	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Outros	Relatorio_sobre_Eventos_Adversos_do_Protocolo.pdf	09/01/2018 12:27:14	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Outros	Relatorio_sobre_os_Eventos_Adversos_do_Protocolo.doc	09/01/2018 12:25:32	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Informacao_inicial_sobre_conducao_do_estudo_no_Brasil_e_sobre_amostras_biologicas.pdf	09/01/2018 12:21:23	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_versao_2_de_19_10_2017.docx	09/01/2018 12:16:54	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_versao_1_de_2006_Emenda_2_de_outubro_de_2017.doc	09/01/2018 12:14:41	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Orçamento	Orçamento.docx	09/01/2018 12:10:11	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Amostras_Biologicas_uso_e_destinacao.docx	09/01/2018 12:08:31	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_submissao_ao_sistema_CEI.docx	09/01/2018 12:05:01	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_CONFIDENCIALIDADE_DO_PARTICIPANTE_DA_PESQUISA_NO_ESTUDO.docx	09/01/2018 12:03:56	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Infraestrutura_e_instalacoes.docx	09/01/2018 12:03:20	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Consubstanciado_Aprovacao_Inicial_CEP.pdf	08/01/2018 11:59:45	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Parecer Anterior	Oficio_Aprovacao_Inicial_CEP.pdf	08/01/2018 11:57:05	Eduardo Magalhães Rego	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Amostras_Biologicas_Uso_e_Destinacao.pdf	08/01/2018 11:53:34	Eduardo Magalhães Rego	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br